

33 528



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :

C12N 15/82, 15/11, 5/10, A01H 5/00,
C07K 14/415, 16/16

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/11188

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

27. März 1997 (27.03.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP96/04109

(22) Internationales Anmeldedatum:

19. September 1996
(19.09.96)

(30) Prioritätsdaten:

195 34 759.5

19. September 1995 (19.09.95) DE

195 47 733.2

20. December 1995 (20.12.95) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PLANT-
TEC BIOTECHNOLOGIE GMBH [DE/DE]; Forschung &
Entwicklung, Hermannswerder 14, D-14473 Potsdam (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOSSMANN, Jens
[DE/DE], Golmer Fichten 9, D-14476 Golm (DE).
LORBERTH, Ruth [DE/DE], Ludwigsfelder Strasse 18,
D-14165 Berlin (DE).(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER (No. 31); Postfach 86 07 67,
D-81634 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, JP, US, europäisches
Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.(54) Title: PLANTS WHICH SYNTHESISE A MODIFIED STARCH, PROCESS FOR THE PRODUCTION THEREOF AND
MODIFIED STARCH(54) Bezeichnung: PFLANZEN, DIE EINE MODIFIZIERTE STÄRKE SYNTHETISIEREN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG
SOWIE MODIFIZIERTE STÄRKE

(57) Abstract

The invention relates to nucleic acid molecules which code a starch-granule-bound protein, and a process and recombinant DNA
molecules for the production of transgenic plant cells and plants which synthesise a modified starch with altered viscosity properties and
an altered phosphate content. It also relates to the plants and plant cells resulting from the process and the starch obtained therefrom.

(57) Zusammenfassung

Es werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die ein Stärkekorn-gebundenes Protein codieren, sowie Verfahren und rekombinante
DNA-Moleküle zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke mit veränderten Viskositätseigenschaften
und einem veränderten Phosphatgehalt synthetisieren. Darüberhinaus werden die aus den Verfahren resultierenden Pflanzenzellen und
Pflanzen und die aus ihnen erhaltliche Stärke beschrieben.

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

PFLANZEN, DIE EINE MODIFIZIERTE STÄRKE SYNTHETISIEREN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG SOWIE MODIFIZIERTE STÄRKE

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die ein Stärkekorn-gebundenes Protein codieren, sowie Verfahren und rekombinante DNA-Moleküle zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke mit veränderten Viskositätseigenschaften und einem veränderten Phosphatgehalt synthetisieren. Die Erfindung betrifft ebenfalls die aus den Verfahren resultierenden transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen und die aus den transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen erhältliche Stärke.

Das Polysaccharid Stärke, das einen der wichtigsten Speicherstoffe im Pflanzenreich darstellt, findet neben der Verwendung im Nahrungsmittelbereich auch eine breite Verwendung als nachwachsender Rohstoff für die Herstellung industrieller Produkte. Um die Anwendung dieses Rohstoffes in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es notwendig, eine große Stoffvielfalt und eine Anpassung an die jeweiligen Anforderungen der zu verarbeitenden Industrie zu erreichen.

Obwohl Stärke aus einem chemisch einheitlichen Grundbaustein, der Glucose, aufgebaut ist, stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Es handelt sich dabei eher um ein komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Verzweigungsgrades und des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten unterscheiden. Man unterscheidet insbesondere die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus α -1,4-verknüpften Glucosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ein Gemisch aus unterschiedlich stark verzweigten Glucoseketten darstellt, wobei die Verzweigungen durch das Auftreten von α -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande kommen.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Die molekulare Struktur der Stärke, die zu einem großen Teil durch den Verzweigungsgrad, das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, die durchschnittliche Kettenlänge sowie das Vorhandensein von Phosphatgruppen bestimmt wird, ist ausschlaggebend für wichtige funktionelle Eigenschaften der Stärke bzw. ihrer wäßrigen Lösungen. Als wichtige funktionelle Eigenschaften sind hierbei beispielsweise zu nennen die Löslichkeit, das Retrogradierungsverhalten, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Farbstabilität, die Verkleisterungseigenschaften, d.h. Binde- und Klebeeigenschaften, sowie die Kältestabilität. Auch die Stärkekorngröße kann für verschiedene Anwendungen von Bedeutung sein. Von besonderem Interesse ist insbesondere die Erzeugung von hochamylosehaltigen Stärken. Ferner kann eine in Pflanzenzellen enthaltene modifizierte Stärke das Verhalten der Pflanzenzelle unter bestimmten Bedingungen vorteilhaft verändern. Denkbar ist beispielsweise eine Verringerung des Stärkeabbaus während der Lagerung von Stärke-enthaltenden Organen, wie z.B. Samen oder Knollen, vor deren weiterer Verarbeitung, z.B. zur Extraktion der Stärke. Ferner ist es von Interesse, modifizierte Stärken herzustellen, die dazu führen, daß Pflanzenzellen oder pflanzliche Organe, die diese Stärke enthalten, besser zur Weiterverarbeitung geeignet sind, beispielsweise bei der Herstellung von "Popcorn" oder "Corn flakes" aus Mais oder von Pommes frites, Chips oder Kartoffelpulver aus Kartoffeln. Von besonderem Interesse ist hierbei die Verbesserung der Stärken in der Hinsicht, daß sie ein reduziertes "cold sweetening" aufweisen, d.h. eine verringerte Freisetzung von reduzierenden Zuckern (insbesondere Glucose) bei einer längeren Lagerung bei niedrigen Temperaturen. Gerade Kartoffeln werden häufig bei Temperaturen von 4-8 °C gelagert, um den Stärkeabbau während der Lagerung zu minimieren. Die hierbei freigesetzten reduzierenden Zucker, insbesondere Glucose, führen beispielsweise bei der Herstellung von Pommes frites oder Chips zu uner-

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

wünschten Bräunungsreaktionen (sogenannte Maillard-Reaktionen).

Die Anpassung der aus Pflanzen isolierbaren Stärke an bestimmte industrielle Verwendungszwecke erfolgt häufig mit Hilfe chemischer Modifikationen, die in der Regel zeit- und kostenintensiv sind. Es erscheint daher wünschenswert, Möglichkeiten zu finden, Pflanzen herzustellen, die eine Stärke synthetisieren, die in ihren Eigenschaften bereits den Anforderungen der verarbeitenden Industrie entspricht.

Herkömmliche Wege zur Herstellung derartiger Pflanzen bestehen in klassischen Züchtungsverfahren und der Erzeugung von Mutanten. So wurde beispielsweise bei Mais eine Mutante erzeugt, die eine Stärke mit veränderten Viskositätseigenschaften synthetisiert (US Patentschrift 5,331,108), sowie eine Maissorte (waxy maize) durch Züchtung etabliert, deren Stärke zu nahezu 100% aus Amylopektin besteht (Akasuka und Nelson, J. Biol. Chem. 241 (1966), 2280-2285). Ferner sind bei Mais und Erbse Mutanten beschrieben worden, die Stärken mit hohem Amylosegehalt synthetisieren (70% in Mais bzw. bis zu 50% in Erbse). Diese Mutanten sind bisher nicht auf molekularer Ebene charakterisiert worden und erlauben somit auch nicht die Erzeugung entsprechender Mutanten in anderen stärke-speichernden Pflanzen.

Alternativ können Pflanzen, die eine Stärke mit veränderten Eigenschaften synthetisieren, mit Hilfe gentechnischer Verfahren erzeugt werden. Beschrieben wurde beispielsweise in mehreren Fällen die gentechnische Veränderung von Kartoffelpflanzen, mit dem Ziel der Veränderung der in den Pflanzen synthetisierten Stärke (z.B. WO 92/11376; WO 92/14827). Voraussetzung für die Anwendung gentechnischer Verfahren ist jedoch die Verfügbarkeit von DNA-Sequenzen, deren Genprodukte einen Einfluß auf die Stärkesynthese, die Stärkemodifikation oder den Stärkeabbau haben.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, Nucleinsäuremoleküle und Verfahren zur Verfügung zu stellen,

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

die es ermöglichen, Pflanzen dahingehend zu verändern, daß sie eine Stärke synthetisieren, die sich hinsichtlich ihrer physikalischen und/oder chemischen Eigenschaften von natürlicherweise in den Pflanzen synthetisierter Stärke unterscheidet, insbesondere eine hochamylosehaltige Stärke, und die somit für allgemeine und/oder spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der unter Seq ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz codieren. Derartige Proteine liegen in den Plastiden pflanzlicher Zellen sowohl an Stärkekörnern gebunden vor, als auch außerhalb von Stärkekörnern in freier, d.h. löslicher Form. Die Enzymaktivität derartiger Proteine führt bei Expression in *E. coli* zu einer erhöhten Phosphorylierung des in den Zellen synthetisierten Glycogens. Das Molekulargewicht dieser Proteine liegt im Bereich von 140-160 kd, wenn es mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese bestimmt wird.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die eine Sequenz mit der unter Seq ID No. 1 angegebenen Nucleotidabfolge, insbesondere die in Seq ID No. 1 angegebenen codierenden Region, umfassen.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein codieren, das in den Plastiden pflanzlicher Zellen zum Teil an Stärkekörnern gebunden vorliegt, und die mit den oben genannten erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren. Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet in diesem Zusammenhang eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

al. (1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind. Diese Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell aus jedem beliebigen Organismus (d.h. Prokaryonten oder Eukaryonten, insbesondere aus Bakterien, Pilzen, Algen, Pflanzen oder tierischen Organismen) stammen, der derartige Nucleinsäuremoleküle besitzt. Sie stammen vorzugsweise aus monokotylen oder dikotylen Pflanzen, insbesondere aus Nutzpflanzen, und besonders bevorzugt aus Stärkespeichernden Pflanzen.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken verschiedener Organismen isoliert werden. Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle aus Pflanzen oder anderen Organismen kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 1 angegebene Sequenz oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten DNA-Fragmenten kann es sich auch um synthetische DNA-Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen DNA-Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Sequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erforderlich.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, deren Sequenzen aufgrund des genetischen Codes degeneriert sind im Vergleich zu den Sequenzen der obengenannten Moleküle, und die ein Protein codieren, das in den Plastiden pflanzlicher Zellen teilweise an Stärkekörner gebunden vorliegt.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle, die das oben beschriebene Protein codieren. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nucleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um das beschriebene Protein zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen dieser Moleküle aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40%, insbesondere eine Identität von mindestens 60%, vorzugsweise über 80% und besonders bevorzugt über 90%. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Nucleinsäuremoleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln.

Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität, pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können prinzipiell aus jedem Organismus stammen, der die beschriebenen Proteine exprimiert, vorzugsweise aus Pflanzen, insbesondere aus stärke-synthetisierenden bzw. stärke-speichernden Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei z.B. Getreidearten (wie Gerste, Roggen, Hafer, Weizen etc.), Mais, Reis, Erbse, Maniok, Kartoffel usw. Ferner können sie durch dem Fachmann geläufige Synthesetechniken hergestellt werden.

Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen kann es sich sowohl um DNA-, beispielsweise um cDNA oder genomische DNA, als auch um RNA-Moleküle handeln.

Ferner betrifft die Erfindung Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulato-

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

rischen Elementen, die die Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder Vektor transformiert und/oder genetisch manipuliert sind, sowie Zellen, die von solchen Zellen abstammen und ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder einen Vektor enthalten. Dabei handelt es sich vorzugsweise um bakterielle Zellen oder um Pflanzenzellen.

Es wurde nun gefunden, daß das durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierte Protein einen Einfluß auf die Stärkesynthese bzw. -modifikation hat, und eine Veränderung der Menge des Proteins in pflanzlichen Zellen zu Veränderungen im Stärkemetabolismus der Pflanzen führt, insbesondere zur Synthese von Stärken mit veränderten physikalischen und chemischen Eigenschaften.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist es somit möglich, mit Hilfe gentechnischer Verfahren Pflanzen herzustellen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, die sich in ihrer Struktur und ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften von in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke unterscheidet. Hierzu werden die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle mit regulatorischen Elementen verknüpft, die die Transkription und Translation in Pflanzenzellen gewährleisten, und in pflanzliche Zellen eingebracht.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, die ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten, wobei dieses mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Die regulatorischen Elemente sind vorzugsweise heterolog in Bezug auf das Nucleinsäuremolekül.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, die die obenbeschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, insbesondere stärkepeichernde Nutzpflanzen, wie z.B. Getreidearten (Roggen, Gerste, Hafer, Weizen etc.), Reis, Mais, Erbse, Maniok und Kartoffel.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren aufgrund der Expression bzw. zusätzlichen Expression eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls eine Stärke, die im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen, d.h. nicht-transformierten Pflanzen, modifiziert ist, insbesondere im Hinblick auf die Viskosität wässriger Lösungen dieser Stärke und/oder den Phosphatgehalt. Dieser ist in der Regel bei der Stärke aus transgenen Pflanzenzellen bzw. Pflanzen erhöht, wodurch die physikalische Eigenschaften der Stärke verändert werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch die aus den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen erhältliche Stärke.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins, das in pflanzlichen Zellen sowohl an Stärkekörner gebunden als auch in löslicher Form vorliegt, bei dem erfindungsgemäße Wirtszellen unter Bedingungen kultiviert werden, die die Expression des Proteins erlauben, und das Protein aus den Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Ferner betrifft die Erfindung die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine sowie Proteine, die durch das oben beschriebene Verfahren erhältlich sind. Es handelt sich dabei vorzugsweise um pflanzliche, kerncodierte Proteine, die in den Plastiden lokalisiert sind. In den Plastiden liegen diese Enzyme sowohl an den Stärkekörnern gebunden vor als auch frei. Die entsprechenden Proteine aus *Solanum tuberosum* weisen in einer SDS-Gelelektrophorese ein Molekulargewicht von 140-160 kd auf und führen bei Expression in *E. coli* zu einer erhöhten Phosphorylierung des in den Zellen synthetisierten Glycogens.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Antikörper, die spezifisch ein erfindungsgemäßes Protein erkennen. Es kann sich hierbei sowohl um monoclonale als auch um polyclonale Antikörper handeln.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül spezifisch hybridisieren und eine Länge von mindestens 15 Nucleotiden aufweisen. Spezifisch hybridisieren bedeutet dabei, daß unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, keine signifikanten Kreuzhybridisierungen mit Sequenzen auftreten, die für andere Proteine codieren. Vorzugsweise haben derartige Nucleinsäuremoleküle eine Länge von mindestens 20, besonders bevorzugt von mindestens 50 und insbesondere von mindestens 100 Nucleotiden. Verwendet werden können solche Moleküle beispielsweise als PCR-Primer, als Hybridisierungsproben oder als DNA-Moleküle, die antisense-RNA codieren.

Es wurde ferner gefunden, daß es möglich ist, die Eigenschaften der in Pflanzenzellen synthetisierten Stärke dadurch zu beeinflussen, daß die Menge an Proteinen, die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codiert werden,

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

in den Zellen verringert wird. Diese Verringerung kann beispielsweise durch antisense-Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, durch Expression geeigneter Ribozyme oder mittels Cosuppression erfolgen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit auch DNA-Moleküle, die eine antisense-RNA codieren, die komplementär ist zu Transkripten eines erfindungsgemäßen DNA-Moleküls. Komplementär bedeutet dabei, daß die codierte RNA nicht 100 % komplementär sein muß, sondern auch ein geringerer Grad an Komplementarität ausreicht, solange sie genügend hoch ist, um bei Expression in pflanzlichen Zellen die Expression eines erfindungsgemäßen Proteins zu inhibieren. Die transkribierte RNA ist vorzugsweise zumindest 90 % und besonders bevorzugt mindestens 95 % komplementär zu einem Transkript eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls. Um bei Transkription in pflanzlichen Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken, sind derartige DNA-Moleküle mindestens 15 bp lang, vorzugsweise länger als 100 bp und besonders bevorzugt länger als 500 bp, jedoch in der Regel kürzer als 5000 bp, vorzugsweise kürzer als 2500 bp.

Ferner betrifft die Anmeldung auch DNA-Moleküle, die bei Expression in pflanzlichen Zellen zur Synthese einer RNA führen, die in den Pflanzenzellen aufgrund eines Cosuppressions-Effektes eine Verringerung der Expression erfindungsgemäßer Nucleinsäuremoleküle hervorruft, die das beschriebene Protein codieren. Das Prinzip der Cosuppression sowie die Herstellung entsprechender DNA-Sequenzen ist beispielsweise ausführlich beschrieben in der WO 90/12084. Derartige DNA-Moleküle codieren vorzugsweise eine RNA, die einen hohen Grad an Homologie zu Transkripten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle hat. Es ist dabei allerdings nicht unbedingt erforderlich, daß die codierte RNA in ein Protein translatierbar ist.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung DNA-Moleküle, die ein RNA-Molekül mit Ribozymaktivität codieren, das spezifisch Transkripte eines erfindungsgemäßen DNA-Moleküls spaltet.

Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle, die in der Lage sind, RNA-Moleküle und spezifische Zielsequenzen zu spalten. Mit Hilfe gentechnologischer Methoden ist es möglich, die Spezifität von Ribozymen zu verändern. Es existieren verschiedene Klassen von Ribozymen. Für die praktische Anwendung mit dem Ziel, das Transkript eines bestimmten Gens gezielt zu spalten, werden bevorzugt Vertreter zweier verschiedener Gruppen von Ribozymen verwendet. Die eine Gruppe wird gebildet von Ribozymen, die dem Typ der Gruppe I-Intron-Ribozymen zuzuordnen sind. Die zweite Gruppe wird von Ribozymen gebildet, die als charakteristisches Strukturmerkmal ein sogenanntes "hammerhead"-Motiv aufweisen. Die spezifische Erkennung des Ziel-RNA-Moleküls kann modifiziert werden durch Änderung der Sequenzen, die dieses Motiv flankieren. Diese Sequenzen bestimmen über Basenpaarung mit Sequenzen im Zielmolekül die Stelle, an der die katalytische Reaktion und somit die Spaltung des Zielmoleküls erfolgt. Da die Sequenzanforderungen für eine effiziente Spaltung äußerst gering sind, ist es im Prinzip möglich, spezifische Ribozyme für praktisch jedes beliebige RNA-Molekül zu entwickeln.

Um DNA-Moleküle herzustellen, die ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte eines erfindungsgemäßen DNA-Moleküls spaltet, wird beispielsweise eine DNA-Sequenz, die eine katalytische Domäne eines Ribozyms codiert, beiderseits mit DNA-Sequenzen verknüpft, die homolog sind zu Sequenzen des Zielenzyms. Als Sequenzen, die die katalytische Domänen codieren, kommen beispielsweise in Frage die katalytische Domäne der Satelliten-DNA des SCMo-Virus (Davies et al., Virology 177 (1990), 216-224) oder die der Satelliten-DNA des TobR-Virus (Steinecke et al., EMBO J. 11 (1992), 1525-1530; Haseloff und Gerlach, Nature 334 (1988), 585-591). Die die katalytische Domäne flankierenden DNA-Sequenzen stammen vor-

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

zugsweise aus den oben beschriebenen erfindungsgemäßen DNA-Molekülen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, die die oben beschriebenen DNA-Moleküle enthalten, insbesondere solche, bei denen die beschriebenen DNA-Moleküle verknüpft sind mit regulatorischen Elementen, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die die beschriebenen DNA-Moleküle oder Vektoren enthalten. Die Wirtszelle kann eine prokaryontische, beispielsweise bakterielle, oder eukaryontische Zelle sein. Bei den eukaryontischen Wirtszellen handelt es sich vorzugsweise um pflanzliche Zellen.

Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzenzellen, die ein oben beschriebenes DNA-Molekül enthalten, das eine antisense-RNA, ein Ribozym oder eine RNA, die zu einem Cosuppressions-Effekt führt, codiert, wobei dieses DNA-Molekül verknüpft ist mit DNA-Elementen, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Diese transgenen Pflanzenzellen können nach gängigen Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Die Erfindung betrifft somit auch Pflanzen, die erhältlich sind durch Regeneration aus den beschriebenen transgenen Pflanzenzellen, sowie Pflanzen, die die beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich wiederum um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, vorzugsweise um Nutzpflanzen, insbesondere stärkepeichernde, wie oben angegeben.

Durch die Expression der beschriebenen DNA-Moleküle, die antisense-RNA, ein Ribozym oder eine "Cosuppressions-RNA" codieren, in den transgenen Pflanzenzellen kommt es zu einer Verringerung der Menge an Proteinen, die durch erfindungsge-

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

mäße DNA-Moleküle codiert werden, die endogen in den Zellen vorliegen. Diese Verringerung hat überraschenderweise eine drastische Veränderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der in den Pflanzenzellen synthetisierten Stärke zur Folge, insbesondere der Viskositätseigenschaften wäßriger Lösungen dieser Stärke, des Phosphatgehaltes als auch der Freisetzung reduzierender Zucker bei Lagerung der Pflanzenzellen oder Pflanzenteile bei niedrigen Temperaturen. Die Eigenschaften der in den transgenen Pflanzenzellen synthetisierten Stärke wird weiter unten ausführlich beschrieben.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch die aus den beschriebenen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen erhaltliche Stärke.

Ferner betrifft die Erfindung die durch die beschriebenen DNA-Moleküle codierten antisense-RNA-Moleküle, sowie RNA-Moleküle mit Ribozymaktivität und RNA-Moleküle, die einen Cosuppressions-Effekt hervorrufen, die durch Transkription erhältlich sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen, die im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen eine modifizierte Stärke synthetisieren, bei dem in den Pflanzenzellen die Menge an Proteinen verringert wird, die durch erfindungsgemäße DNA-Moleküle codiert werden, die endogen in den Zellen vorliegen.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt diese Verringerung mit Hilfe eines antisense-Effektes. Hierzu werden erfindungsgemäße DNA-Moleküle oder Teile davon in antisense-Orientierung mit einem Promotor verknüpft, der die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleistet, sowie gegebenenfalls mit einem Terminationssignal, das die Termination der Transkription sowie die Polyadenylierung des Transkrip-

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

tes gewährleistet. Um einen effizienten antisense-Effekt in den pflanzlichen Zellen zu gewährleisten, sollte die synthetisierte antisense-RNA eine Mindestlänge von 15 Nukleotiden, vorzugsweise von mindestens 100 Nukleotiden und besonders bevorzugt von über 500 Nukleotiden aufweisen. Ferner sollte die die antisense-RNA codierende DNA-Sequenz in bezug auf die zu transformierende Pflanzenspezies homolog sein. Es können jedoch auch DNA-Sequenzen verwendet werden, die einen hohen Grad an Homologie zu endogen in den Zellen vorhandenen DNA-Sequenzen aufweisen, vorzugsweise eine Homologie von mehr als 90%, besonders bevorzugt von mehr als 95%.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verringerung der Menge an Proteinen, die durch die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle codiert werden, durch einen Ribozym-Effekt. Die prinzipielle Wirkungsweise von Ribozymen, sowie die Konstruktion von DNA-Molekülen, die derartige RNA-Moleküle codieren, wurden bereits oben beschrieben. Um in transgenen Zellen eine RNA mit Ribozymaktivität zu exprimieren, werden die oben beschriebenen DNA-Moleküle, die für ein Ribozym codieren, mit DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem Promotor und einem Terminationssignal. Die in den Pflanzenzellen synthetisierten Ribozyme führen zur Spaltung von Transkripten von erfindungsgemäßen DNA-Molekülen, die endogen in den Zellen vorliegen.

Eine weitere Möglichkeit der Verringerung der Menge an Proteinen, die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codiert werden, ist die Cosuppression. Gegenstand der Erfindung sind dabei auch die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Pflanzenzellen, die dadurch charakterisiert sind, daß bei ihnen die Menge an Proteinen verringert ist, die durch die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle codiert werden, und die im Vergleich zu Wildtyp-Zellen eine modifizierte Stärke synthetisieren.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Ferner betrifft die Erfindung Pflanzen, die erhältlich sind durch Regeneration der beschriebenen Pflanzenzellen, sowie Pflanzen, die die beschriebenen erfindungsgemäßen Zellen enthalten.

Die aus den beschriebenen Pflanzenzellen und Pflanzen erhältliche Stärke ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Diese weist im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen veränderte physikalische und chemische Eigenschaften auf. Beispielsweise besitzt diese Stärke im Vergleich zur Stärke aus Wildtyp-Pflanzen einen reduzierten Phosphatgehalt. Ferner zeigen wäßrige Lösungen dieser Stärke veränderte Viskositätseigenschaften.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Phosphatgehalt der beschriebenen Stärke um mindestens 50%, vorzugsweise um mindestens 75% und besonders bevorzugt um mehr als 80% im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen verringert.

Der besondere Vorzug der beschriebenen Stärke liegt in den veränderten Viskositätseigenschaften wäßriger Lösungen dieser Stärke.

Ein gängiger Test, der verwendet wird, um die Viskositätseigenschaften zu bestimmen, ist der sogenannte Brabender-Test. Dieser Test wird durchgeführt unter der Verwendung eines Apparates, der beispielsweise als Viskograph E bekannt ist. Hergestellt und vertrieben wird dieses Instrument unter anderem von der Firma Brabender OHG Duisburg (Deutschland).

Der Test besteht im wesentlichen darin, daß Stärke in Gegenwart von Wasser zunächst erhitzt wird, um zu bestimmen, wann die Hydratisierung und das Schwellen der Stärkekörner einsetzt. Dieser Vorgang, der auch als Gelatinisierung bzw. Verkleisterung bezeichnet wird, beruht auf der Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen und geht einher mit einer meßbaren Viskositätszunahme der Stärkesuspension. Während eine weitere Erhitzung nach der Gelatinisierung zur vollständigen

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Auflösung der Stärkepartikel und einer Abnahme der Viskosität führt, kommt es bei einer Abkühlung unmittelbar nach der Gelatinisierung typischerweise zu einer Viskositätszunahme (siehe Fig. 3). Das Resultat eines Brabendertests ist eine Kurve, die die Viskosität in Abhängigkeit von der Zeit angibt, wobei zunächst eine Temperaturzunahme bis über die Gelatinisierungstemperatur und anschließend eine Abkühlung erfolgt.

Die Analyse einer Brabender-Kurve zielt in der Regel ab auf die Bestimmung der Verkleisterungstemperatur, der maximalen Viskosität bei Erhitzen, der Viskositätszunahme bei Abkühlung, sowie der Viskosität nach dem Erkalten. Diese Parameter sind wichtige Charakteristika, die die Qualität einer Stärke sowie ihre Verwendbarkeit für verschiedene Anwendungen bestimmen.

Die Stärke, die sich beispielsweise aus Kartoffelpflanzen isolieren läßt, bei denen durch einen antisense-Effekt die Menge an erfindungsgemäßen Proteinen in den Zellen reduziert wurde, zeigt Charakteristika, die stark von denen abweichen, die Stärke zeigt, die aus Wildtyppflanzen isolierbar ist. Im Vergleich zu diesen zeigt sie nur eine geringe Viskositätszunahme beim Erhitzen, eine geringere maximale Viskosität, sowie eine stärkere Viskositätszunahme beim Erkalten (siehe Fig. 3, 4 und 5).

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung somit eine Stärke, deren wäßrige Lösungen die in Fig. 4 oder 5 dargestellten charakteristischen Viskositätseigenschaften besitzen. Die modifizierte Stärke weist, insbesondere unter den in Beispiel 8 a genannten Bedingungen zur Bestimmung der Viskosität mit Hilfe eines Brabender-Viskosimeters, das Charakteristikum auf, daß während des Aufkochens im Vergleich zu Wildtypstärke nur eine geringe Viskositätszunahme erfolgt. Dies bietet die Möglichkeit, die erfindungsgemäße

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Stärke zur Herstellung höher konzentrierter Kleister zu verwenden.

2 Ferner weist die modifizierte Stärke die Eigenschaft auf, daß es nach Erreichen der maximalen Viskosität nur zu einer geringen Viskositätsabnahme kommt. Dagegen kommt es bei einem Erkalten zu einer starken Viskositätszunahme, so daß die Viskosität höher ist als die einer Stärke aus Wildtyp-Pflanzen.

Weiterhin ist es möglich, durch Verringerung der Menge an erfindungsgemäßen Proteinen in transgenen Pflanzenzellen eine Stärke herzustellen, die bei Lagerung von Pflanzenteilen, die diese Stärke enthalten, bei niedrigen Temperaturen, insbesondere bei 4-8 °C, zu einer verringerten Freisetzung reduzierender Zucker führt im Vergleich zu Stärke aus nicht-transformierten Zellen. Diese Eigenschaft ist beispielsweise besonders vorteilhaft für die Bereitstellung von Kartoffeln, die bei Lagerung bei niedrigen Temperaturen eine verringerte Freisetzung von reduzierenden Zuckern aufweisen, d.h. ein verringertes "cold sweetening". Derartige Kartoffeln sind besonders gut geeignet zur Herstellung von Pommes frites, Chips oder ähnlichem, da bei ihrer Verwendung unerwünschte Bräunungsreaktionen (Maillard-Reaktionen) ausbleiben oder zumindestens stark verringert sind.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird in den transformierten Pflanzenzellen nicht nur die Synthese eines erfindungsgemäßen Proteins reduziert, sondern darüber hinaus auch die Synthese mindestens eines weiteren, an der Stärkesynthese und/oder Modifikation beteiligten Enzyms. Bevorzugt sind dabei beispielsweise stärkekornggebundene Stärkesynthasen oder Verzweigungsenzyme. Es wurde überraschend gefunden, daß Kartoffelpflanzen, bei denen die Synthese des erfindungsgemäßen Proteins sowie auch des Verzweigungsenzyms aufgrund eines antisense-Effekts reduziert ist, eine Stärke synthetisieren, die in ihren Eigenschaften stark abweicht von Stärke aus Wildtyppflanzen.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Im Vergleich zu Wildtypstärke zeigen wäßrige Lösungen dieser modifizierten Stärke so gut wie keine Viskositätszunahme beim Erhitzen oder beim Abkühlen (vgl. Fig. 6).

Des weiteren zeigt eine mikroskopische Analyse der Stärkekörner vor und nach dem Erhitzen deutlich, daß im Gegensatz zur Wildtypstärke die Stärkekörner aus derart veränderten Pflanzen nicht aufgeschlossen sind, sondern ihre ursprüngliche Struktur annähernd beibehalten. Es handelt sich somit um eine gegenüber dem Kochprozeß resistente Stärke. Wird von dieser Stärke der Amylosegehalt bestimmt mittels der in dem Beispielsteil beschriebenen Methodik, so ergeben sich Amylosegehalte von über 50 %, vorzugsweise über 60 % und besonders bevorzugt über 70 % für diese Stärke. Die wäßrigen Lösungen der aus diesen Pflanzen isolierbaren Stärke zeigen vorzugsweise die in Fig. 6 dargestellten charakteristischen Viskositätseigenschaften.

Eine derartige erfindungsgemäße hochamylosehaltige Stärke weist gegenüber Wildtypstärke eine Reihe von Vorteilen für verschiedene Verwendungen auf. So besitzen hochamylosehaltige Stärken ein hohes Potential zur Nutzung in Folien und Filmen. Die auf der Grundlage von hochamylosehaltigen Stärken erzeugten Folien und Filme, die in weitesten Bereichen der Verpackungsindustrie eingesetzt werden können, besitzen den deutlichen Vorteil, daß sie biodegradierbar sind. Neben dieser Anwendung, die im wesentlichen von in klassischer Weise auf der Erdölchemie basierenden Polymeren abgedeckt wird, besitzt die Amylose noch weitere unikate Anwendungsfelder, die durch die Eigenschaft der Amylose bedingt sind, eine Helix zu bilden. Die von der Amylose gebildete Helix ist im Inneren hydrophob und außen hydrophil. Aufgrund dessen kann Amylose zur Komplexierung und molekularen Verkapselung niedermolekularer oder auch höher molekularer Substanzen eingesetzt werden. Beispiele dafür sind:

- die molekulare Verkapselung von Vitaminen und Wirkstoffen mit dem Ziel des Schutzes vor Oxydation, Verflüchtigung,

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

thermischem Abbau oder aber der Überführung in ein wäßriges Milieu;

- die molekulare Verkapselung von Aromastoffen zur Erhöhung der Löslichkeit;
- die molekulare Verkapselung von Düngemitteln/Pestiziden zur Stabilisierung und kontrollierten Freisetzung;
- die molekulare Verkapselung von Arzneistoffen zur Stabilisierung der Dosierbarkeit und kontrollierten Freisetzung von Retardpräparaten.

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Amylose ist die Tatsache, daß es sich um ein chirales Molekül handelt. Aufgrund der Chiralität kann es präferentiell nach Immobilisierung beispielsweise an einer Säule zur Trennung von Enantiomeren eingesetzt werden.

Weiterhin wurde überraschend gefunden, daß Stärke, die sich aus Kartoffelpflanzen isolieren läßt, bei denen durch einen antisense-Effekt die Menge an erfindungsgemäßen Proteinen in den Zellen reduziert wird, in Kombination mit einer Reduktion der Proteine, die die enzymatische Aktivität einer stärkekorngelassenen Stärkesynthase der Isoform I (GBSSI) aufweisen, Charakteristika zeigt, die stark von denen abweichen, die Stärke zeigt, die aus Wildtyppflanzen isolierbar ist. Im Vergleich zu Stärke aus Wildtyppflanzen zeigen wäßrige Lösungen dieser Stärke nur eine geringe Viskositätszunahme beim Erhitzen, eine geringere maximale Viskosität sowie so gut wie keine Viskositätszunahme beim Erkalten (vgl. Fig. 7). Wenn von dieser Stärke das Verhältnis Amylose zu Amylopektin bestimmt wird, zeichnet sich diese Stärke dadurch aus, daß fast keine Amylose mehr nachweisbar ist. Der Amylosegehalt dieser Stärke liegt vorzugsweise unter 5%, besonders bevorzugt unter 2%. Die erfindungsgemäße Stärke unterscheidet sich ferner von der bekannten Stärke, die durch Inhibierung des GBSSI-Gens alleine mittels gentechnischer Verfahren in transgenen Kartoffelpflanzen erzeugt werden

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

kann. So weist diese Stärke eine starke Viskositätszunahme beim Erhitzen auf. Die wäßrigen Lösungen der erfindungsgemäßen Stärke zeigen vorzugsweise die in Fig. 7 dargestellten charakteristischen Viskositätseigenschaften. Insbesondere unter den im Beispiel 13 genannten Bedingungen zur Bestimmung der Viskosität mit Hilfe eines Rapid Visco Analysers weist die modifizierte Stärke das Charakteristikum auf, daß während des Aufkochens im Vergleich zur Wildtypstärke, aber auch im Vergleich zur waxy- Stärke nur eine geringe Viskositätszunahme erfolgt. Dies bietet die Möglichkeit, die erfindungsgemäße Stärke zur Herstellung höher konzentrierter Kleister zu verwenden. Ferner weist die modifizierte Stärke die Eigenschaft auf, daß es nach Erreichen der maximalen Viskosität nur zu einer geringeren Viskositätsabnahme kommt sowie zu so gut wie keiner Viskositätszunahme beim Erkalten.

Möglichkeiten zur Verringerung der Aktivität eines Verzweigungsenzyms in pflanzlichen Zellen wurden bereits beschrieben, beispielsweise in der WO 92/14827 und der WO 95/26407. Die Verringerung der Aktivität einer stärkekorngelundenen Stärkesynthase der Isoform I (GBSSI) kann unter der Verwendung von dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen, beispielsweise mittels eines antisense-Effekts. DNA-Sequenzen, die eine GBSSI aus Kartoffel codieren, sind beispielsweise bekannt aus Hergersberg (Dissertation (1988) Universität Köln, Visser et al. (Plant Sci. 64 (1989), 185-192) oder van der Leij et al. (Mol. Gen. Genet. 228 (1991), 240-248).

Das erfindungsgemäße Verfahren kann prinzipiell auf alle Pflanzenspezies angewendet werden. Von Interesse sind sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen, insbesondere Nutzpflanzen und hierbei bevorzugt stärkepeichernde Pflanzen, wie z.B. Getreidepflanzen (Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, etc.), Reis, Mais, Erbse, Maniok und Kartoffel.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Unter dem Begriff "regulatorische DNA-Elemente, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten" werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung DNA-Abschnitte verstanden, die die Initiation bzw. die Termination der Transkription in pflanzlichen Zellen ermöglichen. Zu den DNA-Abschnitten, die die Initiation der Transkription gewährleisten zählen insbesondere Promotoren.

Für die Expression der verschiedenen oben beschriebenen erfindungsgemäßen DNA-Moleküle in Pflanzen kommt im Prinzip jeder in pflanzlichen Zellen funktionale Promotor in Betracht. Der Promotor kann homolog oder heterolog in bezug auf die verwendete Pflanzenspezies sein. Geeignet ist beispielsweise der 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Odell et al., Nature 313 (1985), 810-812), der eine konstitutive Expression in allen Geweben einer Pflanze gewährleistet und das in der WO/9401571 beschriebene Promotorkonstrukt. Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt (siehe beispielsweise WO/9307279) oder in einem bestimmten Gewebe der Pflanze zu einer Expression nachfolgender Sequenzen führen (siehe z. B. Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2245-2251). Präferentiell werden Promotoren eingesetzt, die in den stärkespeichernden Organen der zu transformierenden Pflanzen aktiv sind. Dies sind beim Mais die Maiskörner, während es bei der Kartoffel die Knollen sind. Zur Transformation der Kartoffel kann insbesondere, aber nicht ausschließlich, der knollenspezifische B33-Promotor (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) verwendet werden.

Neben Promotoren können DNA-Abschnitte zur Initiation der Transkription auch DNA-Sequenzen enthalten, die eine weitere Steigerung der Transkription gewährleisten, beispielsweise sogenannte Enhancer-Elemente.

Ferner kann der Begriff "regulatorische DNA-Elemente" auch Terminationssignale umfassen, die der korrekten Beendigung der Transkription sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

an das Transkript dienen, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben und sind beliebig austauschbar. Beispiele für derartige Terminationssequenzen sind die 3'-nichttranslatierten Regionen, die das Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthase-Gens (NOS-Gen) oder des Octopinsynthase-Gens (Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) aus Agrobakterien umfassen, oder die 3'-nichttranslatierten Regionen der Gene der Speicherproteine aus Sojabohne, sowie die der Gene der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase (ssRUBISCO).

Die Einführung erfindungsgemäßer DNA-Moleküle in pflanzliche Zellen erfolgt vorzugsweise unter Verwendung von Plasmiden. Vorzugsweise werden dafür Plasmide verwendet, die eine stabile Integration der eingeführten DNA in das pflanzliche Genom gewährleisten.

In den Beispielen der vorliegenden Erfindung wird der binäre Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-230) verwendet. Bei diesem Vektor handelt es sich um ein Derivat des binären Vektors pBin19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-8721), der kommerziell erhältlich ist (Clontech Laboratories, Inc., USA).

Es ist jedoch auch jeder andere Pflanzentransformationsvektor geeignet, in den eine Expressionskassette inseriert werden kann, und der die Integration der Expressionskassette in das pflanzliche Genom gewährleistet.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E.coli-Zellen verwendet. Transformierte

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

E.coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium kultiviert, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird nach Standardmethoden wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen und Sequenzanalysen eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid DNA gespalten werden und resultierende DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen *Linker* oder *Polylinker*, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al., Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). Die zur Transformation der Agrobakterien verwendeten Plasmide enthalten weiterhin ein Selektionsmarkergen, beispielsweise das NPT II-Gen, das die Selektion transformierter Bakterien erlaubt. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine *vir*-Region trägt, enthalten. Die *vir*-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offset-drukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46 und An et al., EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben worden. Binäre Vektoren sind bereits z.T. kommerziell erhältlich, z.B. pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc., USA).

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Die aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen bzw. Pflanzen erhältliche Stärke eignet sich aufgrund ihrer Eigenschaften neben den bereits oben angesprochenen speziellen Verwendungszwecken für verschiedene industrielle Verwendungen.

Grundsätzlich läßt sich Stärke in zwei große Kategorien unterteilen, die Hydrolyseprodukte der Stärke und die sogenannten nativen Stärken. Zu den Hydrolyseprodukten zählen im wesentlichen die über enzymatische oder chemische Verfahren erhaltene Glucose sowie Glucosebausteine, die für weitere Prozesse, wie Fermentation, oder auch weitere chemische Mo-

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

difikationen eingesetzt werden können. In diesem Bereich kann die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens, wie es gegenwärtig im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase verläuft, von Bedeutung sein. Darunter läßt sich vorstellen, daß ein geringerer Einsatz von für die Hydrolyse eingesetzten Enzymen durch Veränderung der Struktur der Stärke, z.B. größere Oberfläche des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder sterische, die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme limitierende Struktur, zu einer Kosteneinsparung führen kann.

Die Verwendungen der sogenannten nativen Stärken, die wegen ihrer polymeren Struktur eingesetzt werden, lassen sich in zwei große Bereiche unterteilen:

(a) Verwendung im Nahrungsmittelbereich

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungs-temperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

(b) Einsatz im Nicht-Nahrungsmittelbereich

Der andere große Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff bei unterschiedlichen Herstellungsprozessen bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten. Der wesentliche Einsatzbereich für die Verwendung von Stärke als Hilfsstoff ist zum einen die Papier- und Pappeindustrie. Stärke wird dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Ab-

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

bindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsmittel und zur Entwässerung eingesetzt. Darüberhinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden.

Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißegrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich ist der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität wichtig. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfluß von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

Ein großer Einsatzbereich besteht beispielsweise in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90% der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln oder Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungseleimen für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Eine weitere mögliche Verwendung als Hilfsmittel und Zusatzstoff besteht bei der Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfsmittel zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, als Mittel zur Textilaufkrüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

Ferner kann die Stärke als Zusatz bei Baustoffen verwendet werden. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton kann die Stärke zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt werden.

Ferner bietet sich die Stärke zur Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

Ferner kann die Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate verwendet werden. So werden Stärken beispielsweise zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt.

Ein wichtiges Einsatzgebiet besteht ferner im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt werden. Weiterhin eignet sich die Stärke als Tabletzensprengmittel, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbiert und nach kurzer Zeit so weit quillt, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder sind weitere Anwendungsmöglichkeiten. Im Bereich der Kosmetik kann die Stärke beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt werden. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

Auch die Verwendung der Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Briketts ist denkbar. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6%, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5%. Desweiteren eignet sich die Stärke als Bindemittel, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel-versetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüberhinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens. Dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut. Ebenso kann sie für die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks eingesetzt werden.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit der modifizierten Stärke besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozess (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyethylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyethylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung der Stärke in Polyethylenfolien

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatik-verhalten, ein verbessertes Antiblock-verhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wäßrigen Farben erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärke gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrißdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Möglich ist nicht nur die Produktentwicklung von Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen sind mit einem Stärkegehalt von über 50% herzustellen. Ferner weisen die Stärke/Polymermischungen den Vorteil auf, daß sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin aufgrund ihres extremen Wasserbindungsvermögens Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepfropfenpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Diese Superabsorber werden

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

hauptsächlich im Hygienebereich verwendet, z.B. bei Produkten wie Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz der neuen gentechnischen veränderten Stärke sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallisation, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgenden Merkmalen münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur, Transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität. Besonders hervorzuheben ist ferner die Viskosität.

Ferner kann die aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen bzw. Pflanzen erhaltene modifizierte Stärke weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt oder zu neuen Einsatzgebieten. Diese chemischen Modifikationen sind dem Fachmann grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch

- Säurebehandlung
- Oxidation
- Veresterung (Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken. Weitere organische Säuren können ebenfalls zur Veresterung eingesetzt werden.)
- Erzeugung von Stärkeethern (Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether)
- Erzeugung von vernetzten Stärken

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

- Erzeugung von Stärke-Pfropf-Polymerisaten.

Gegenstand der Erfindung ist auch Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, wie z.B. Samen, Früchte, Stecklinge, Knollen oder Wurzelstöcke, wobei dieses erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthält.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Hinterlegungen

Folgende im Rahmen der vorliegenden Erfindung hergestellten und/oder verwendeten Plasmide wurden bei der als internationale Hinterlegungsstelle anerkannten Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) in Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, entsprechend den Anforderungen des Budapester Vertrages für die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke der Patentierung hinterlegt

(Hinterlegungsnummer; Hinterlegungsdatum):

Plasmid pBinAR Hyg	(DSM 9505)	(20.10.1994)
Plasmid p33-anti-BE	(DSM 6146)	(20.08.1990)
Plasmid pRL2	(DSM 10225)	(04.09.1995)

Verwendete Medien und Lösungen

Elutionspuffer	25 mM Tris pH 8,3
	250 mM Glycin
Dialysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,0
	50 mM NaCl
	2 mM EDTA
	14,7 mM β -Mercaptoethanol
	0,5 mM PMSF
Proteinpuffer	50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2
	10 mM EDTA
	0,5 mM PMSF
	14,7 mM β -Mercaptoethanol
Lugolsche Lösung	12 g KI
	6 g I ₂
	ad 1,8 l mit ddH ₂ O

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

20 x SSC

175.3 g NaCl

88.2 g Natrium-Citrat

ad 1000 ml mit ddH₂O

pH 7,0 mit 10 N NaOH

10 x MEN

200 mM MOPS

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA

pH 7, 0

NSEB-Puffer

0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2

7% SDS

1 mM EDTA

1% BSA (w/v)

Beschreibung der Abbildungen**Fig. 1 zeigt das Plasmid p35S-anti-RL.****Aufbau des Plasmids:****A = Fragment A:** CaMV 35S-Promotor, nt 6909-7437 (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294)**B = Fragment B:** ca. 1949 bp-langes Asp718-Fragment aus pRL1

Orientierung zum Promotor: anti-sense

Der Pfeil gibt die Richtung des offenen Leserasters an.

C = Fragment C: nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846)

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Fig. 2 zeigt das Plasmid pB33-anti-RL

Aufbau des Plasmids:

A = Fragment A: B33-Promotor des Patatin-Gens B33 aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29)

B = Fragment B: ca. 1949 bp-langes Asp718-Fragment aus pRL1

Orientierung zum Promotor: anti-sense

Der Pfeil gibt die Richtung des offenen Leserasters an.

C = Fragment C: nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846)

Fig. 3 zeigt eine mit einem Brabender-Viskograph vom Typ Viskograph E aufgezeichnete Brabender-Kurve einer wäßrigen Lösung von Stärke, die aus nicht-transformierten Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée isoliert wurde (siehe Beispiel 8).

Dabei bedeuten:	Drehm.	Drehmoment
	[BE]	Brabender-Einheiten
	Temp.	Temperatur
	A	Verkleisterungsbeginn
	B	Maximale Viskosität
	C	Start der Haltezeit
	D	Start der Kühlzeit
	E	Ende der Kühlzeit
	F	Ende der End-Haltezeit

Die blaue Linie gibt die Viskosität an; die rote den Temperaturverlauf.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Fig. 4 zeigt eine mit einem Brabender-Viskograph vom Typ Viskograph E aufgezeichnete Brabender-Kurve einer wäßrigen Lösung von Stärke, die aus Kartoffelpflanzen isoliert wurde, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL transformiert worden waren (siehe Beispiel 8). Für die Bedeutung der Abkürzungen siehe Figur 3.

Fig. 5 zeigt eine mit einem Brabender-Viskograph vom Typ Viskograph E aufgezeichnete Brabender-Kurve einer wäßrigen Lösung von Stärke aus Kartoffeln, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren (siehe Beispiel 8). Für die Bedeutung der Abkürzungen siehe Figur 3.

Fig. 6 zeigt mit einem Rapid Visco Analyser aufgezeichnete Kurven wäßriger Stärkelösungen, die aus Kartoffelpflanzen isoliert wurden (siehe Beispiel 12). Die rote Linie gibt den Temperaturverlauf an, die blauen Linien 1, 2, 3 und 4 die Viskositäten folgender Stärkelösungen:

- Linie 1: Stärke, die aus Wildtyppflanzen isoliert worden ist,
- Linie 2: Stärke, die aus Pflanzen isoliert worden ist, bei denen das Verzweigungsenzym alleine inhibiert wurde (vgl. Beispiel 1 der Patentanmeldung WO92/14827),
- Linie 3: Stärke, die aus Pflanzen isoliert worden ist, bei denen lediglich die erfindungsgemäßen Proteine in ihrer Konzentration verringert wurden (vgl. Beispiel 6).
- Linie 4: Stärke, die aus Pflanzen isoliert worden ist, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL in Kombination mit dem Plasmid p35SH-anti-BE (vgl. Beispiel 12) transformiert worden sind.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Fig. 7 zeigt mit einem Rapid Visco Analyser aufgezeichnete Kurven wäßriger Stärkelösungen, die aus Kartoffelpflanzen isoliert wurden (siehe Beispiel 13). Die rote Linie gibt den Temperaturverlauf an, die blauen Linien 1, 2, 3 und 4 die Viskositäten folgender Stärkelösungen:

Linie 1: Stärke, die aus Wildtyppflanzen isoliert worden ist,

Linie 2: Stärke, die aus Pflanzen isoliert worden ist, die allein mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI isoliert wurde (sog. waxy-Kartoffel),

Linie 3: Stärke, die aus Pflanzen isoliert worden ist, die allein mit dem Plasmid p35S-anti-RL transformiert wurde (vgl. Beispiel 6),

Linie 4: Stärke, die aus Pflanzen isoliert worden ist, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL in Kombination mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI (vgl. Beispiel 13) transformiert worden sind.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

In den Beispielen wurden folgende Standardtechniken angewendet:

1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung in *E.coli* wurde der Vektor pBluescriptSK verwendet.

Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-230) und B33-Hyg kloniert.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

2. Bakterienstämme

Für den pBluescript-Vektor und für die pBinAR- und B33-Hyg-Konstrukte wurde der *E.coli*-Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet.

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes C58C1 pGV2260 durchgeführt (Deblaere et al., Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777:4788).

3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfigen & Willmitzer (Nucleic Acids Res. 16 (1988), 9877). Die Plasmid-DNA transformierter *Agrobakterien* wurde nach der Methode von Birnboim & Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

4. Transformation von Kartoffeln

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L.cv. Desiree) wurden in 10 ml MS-Medium (Murashige & Skoog, Physiol. Plant. 15 (1962), 473-497) mit 2% Saccharose gelegt, welches 50 μ l einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthielt. Nach 3-5 minütigem, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glucose, 5 mg/l Naphthylelessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin bzw. 1 mg/l Hygromycin B, und 0,80% Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glucose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20 mg/l Naphthylelessigsäure, 20 mg/l Gibberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin bzw. 3 mg/l Hygromycin B, und 0,80% Bacto Agar gelegt.

5. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radiokative Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma Boehringer (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

6. Northern Blot-Analyse

RNA wurde nach Standardprotokollen aus Blattgewebe von Pflanzen isoliert. 50 µg der RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (1,5% Agarose, 1 x MEN-Puffer, 16,6% Formaldehyd). Das Gel wurde nach dem Gellauf kurz in Wasser gewaschen. Die RNA wurde mit 20 x SSC mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran vom Typ Hybond N (Amersham, UK) transferiert. Die Membran wurde anschließend bei 80°C unter Vakuum für zwei Stunden gebacken. Die Membran wurde in NSEB-Puffer für 2 h bei 68°C prähybridisiert und anschließend in NSEB-Puffer über Nacht bei 68°C in Gegenwart der radioaktiv markierten Probe hybridisiert.

7. Pflanzenhaltung

Kartoffelpflanzen wurden im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen gehalten:

Lichtperiode	16 h bei 25000 Lux und 22°C
Dunkelperiode	8 h bei 15 °C
Luftfeuchte	60%

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

8. Bestimmung des Amylose/Amylopektinverhältnisses in Stärke aus Kartoffelpflanzen

Stärke wurde nach Standardmethoden aus Kartoffelpflanzen isoliert und das Verhältnis Amylose zu Amylopektin nach der von Hovenkamp-Hermelink et al. beschriebenen Methode (Potato Research 31 (1988) 241-246) bestimmt.

9. Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose

Zur Bestimmung des Glucose-, Fructose- bzw. Saccharosegehalts werden kleine Knollenstücke (Durchmesser ca. 10 mm) von Kartoffelknollen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für 30 min bei 80 °C in 0,5 ml 10 mM HEPES, pH 7,5; 80% (Vol./Vol.) Ethanol extrahiert. Der Überstand, der die löslichen Bestandteile enthält, wird abgenommen und das Volumen bestimmt. Der Überstand wird zur Bestimmung der Menge an löslichen Zuckern verwendet. Die quantitative Bestimmung von löslicher Glucose, Fructose und Saccharose wird in einem Ansatz mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

100,0 mM Imidazol/HCl, pH 6,9

1,5 mM MgCl₂

0,5 mM NADP⁺

1,3 mM ATP

10-50 µl Probe

1,0 U Glucose-6-Phosphatdehydrogenase aus Hefe

Der Ansatz wird für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Zucker erfolgt anschließend mittels gängiger photometrischer Methoden durch Messung der Absorption bei 340 nm nach der aufeinanderfolgenden Zugabe von

1,0 Einheiten Hexokinase aus Hefe

(zur Bestimmung von Glucose)

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

1,0 Einheiten Phosphoglucoisomerase aus Hefe
(zur Bestimmung von Fructose)
und
1,0 Einheiten Invertase aus Hefe
(zur Bestimmung von Saccharose).

Beispiel 1

Isolierung Stärkekorn-gebundener Proteine aus Kartoffelstärke

Die Isolierung von Stärkekorn-gebundenen Proteinen aus Kartoffelstärke erfolgte durch Elektroelution in einer Elutionsvorrichtung, die analog zu dem "Model 422 Electro-Eluter" (BIORAD Laboratories Inc., USA) konstruiert war, aber ein wesentlich größeres Volumen aufwies (ca. 200 ml). Es wurden 25 g getrocknete Stärke in Elutionspuffer aufgenommen (Endvolumen 80 ml). Die Stärke stammte aus Kartoffeln, die aufgrund der anti-sense-Expression einer DNA-Sequenz, die für die Stärkekorn-gebundene Stärkesynthase I (GBSS I) aus Kartoffel kodiert, eine nahezu amylosefreie Stärke produzieren. Die Suspension wurde im Wasserbad auf 70-80°C erwärmt. Anschließend wurden 72,07 g Harnstoff zugegeben (Endkonzentration 8 M) und das Volumen mit Elutionspuffer auf 180 ml aufgefüllt. Die Stärke löste sich unter ständigem Rühren und bekam eine kleisterartige Konsistenz. Die Proteine wurden aus der Lösung mit Hilfe der Elutionsvorrichtung über Nacht elektroeluiert (100 V; 50-60 mA). Die eluierten Proteine wurden vorsichtig aus der Appatur entnommen. Schwebstoffe wurden durch kurze Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde 2-3 mal je eine Stunde bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysiert. Anschließend wurde das Volumen der Proteinlösung bestimmt. Die Proteine wurden durch Zugabe von Ammoniumsulfat (90% Endkonzentration) gefällt. Die Zugabe erfolgte unter ständigem Rühren bei 0°C. Die gefällten Pro-

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

teine wurden durch Zentrifugation pelletiert und in Proteinpuffer aufgenommen.

Beispiel 2

Identifizierung und Isolierung von cDNA-Sequenzen, die für Stärkekornggebundene Proteine kodieren

Die gemäß Beispiel 1 isolierten Proteine wurden zur Herstellung von polyclonalen Antikörpern aus Kaninchen verwendet, die spezifisch Stärkekornggebundene Proteine erkennen. Mit Hilfe derartiger Antikörper wurde anschließend nach Standardmethoden eine cDNA-Expressionsbibliothek nach Sequenzen durchgemustert, die für Stärkekornggebundene Proteine kodieren.

Die Expressionsbibliothek wurde folgendermaßen hergestellt: Aus Kartoffelknollen der Kartoffelvarietät "Berolina" wurde nach Standardmethoden poly(A⁺)-mRNA isoliert. Ausgehend von der poly(A⁺)-mRNA wurde nach der Methode von Gubler und Hoffmann (Gene 25 (1983), 263-269) unter Verwendung eines Xho I-Oligo d(t)₁₈-Primers cDNA hergestellt. Diese wurde nach EcoR I-Linkeraddition mit Xho I nachgeschnitten und orientiert in einen mit EcoR I und Xho I geschnittenen Lambda ZAP II-Vektor (Stratagene) ligiert. Ca. 500.000 Plaques einer derart konstruierten cDNA-Bibliothek wurden nach Sequenzen durchgemustert, die von polyclonalen Antikörpern, die gegen Stärkekornggebundene Proteine gerichtet sind, erkannt wurden.

Zur Analyse der Phagenplaques wurden diese auf Nitrozellulosefilter übertragen, die vorher für 30-60 min in einer 10 mM IPTG-Lösung inkubiert und anschließend auf Filterpapier getrocknet wurden. Der Transfer erfolgte für 3 h bei 37°C. Anschließend werden die Filter für 30 min bei Raumtemperatur in Blockreagenz inkubiert und zweimal für 5-10 min in TBST-Puffer gewaschen. Die Filter wurden mit den gegen Stärke-

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

korn-gebundene Proteine gerichteten polyclonalen Antikörpern in geeigneter Verdünnung für 1 h bei Raumtemperatur oder für 16 h bei 4°C geschüttelt. Die Identifizierung von Plaques, die ein Protein exprimierten, das von den polyclonalen Antikörpern erkannt wurde, erfolgte mit Hilfe des "Blotting detection kit for rabbit antibodies RPN 23" (Amersham UK) nach den Angaben des Herstellers.

Phagenclone der cDNA-Bibliothek, die ein Protein exprimierten, das von den polyclonalen Antikörpern erkannt wurde, wurden unter Anwendung von Standardverfahren weiter gereinigt.

Mit Hilfe der in-vivo-excision-Methode wurden von positiven Phagenclonen *E. coli*-Klone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBluescript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertionen wurde ein geeigneter Clon, pRL1, weiter analysiert.

Beispiel 3

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pRL1

Aus einem entsprechend Beispiel 2 erhaltenen *E. coli*-Clon wurde das Plasmid pRL1 isoliert und ein Teil der Sequenz seiner cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxynukleotidmethode (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467) bestimmt. Die Insertion ist ca. 2450 bp lang. Ein Teil der Nukleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist unter Seq ID No. 3 und Seq ID No. 4 angegeben.

Eine Sequenzanalyse und ein Sequenzvergleich mit bekannten DNA-Sequenzen zeigte, daß die unter Seq ID No. 3 dargestellte Sequenz neu ist und keine signifikante Homologie zu bisher bekannten DNA-Sequenzen aufweist. Die Sequenzanalyse zeigte weiterhin, daß es sich bei der cDNA-Insertion nur um

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

eine partielle cDNA handelt, bei der ein Teil der codierenden Region am 5'-Ende fehlt.

Beispiel 4

Identifizierung und Isolierung einer vollständigen cDNA, die für ein Stärkekorn-gebundenes Protein aus *Solanum tuberosum* codiert

Zur Isolierung einer, der partiellen cDNA-Insertion des Plasmids pRL1 entsprechenden, vollständigen cDNA, wurde eine weitere cDNA-Bibliothek hergestellt. Dabei handelte es sich um eine Schließzellen-spezifische cDNA-Bibliothek aus *Solanum tuberosum*, die folgendermaßen konstruiert wurde:

Zunächst wurden Epidermisfragmente von Blättern von Kartoffelpflanzen der Varietät Desirée im wesentlichen nach der Methode von Hedrich et al. (Plant Physiol. 89 (1989), 148) hergestellt indem ca. 60 Blätter von sechs Wochen alten, im Gewächshaus gehaltenen Kartoffelpflanzen geerntet wurden. Aus den Blättern wurde die Mittelrippe entfernt. Anschließend wurden die Blätter in einem großen "Waring blender" (Volumen 1 Liter) in gekühltem destilliertem H₂O viermal für je 15 Sekunden auf höchster Stufe zerkleinert. Die Suspension wurde durch ein Nylonsieb mit einer Porengröße von 220 µm (Nybolt, Zürich, Schweiz) filtriert und mehrmals mit kaltem destilliertem Wasser gewaschen. Die Suspension wurde wiederum durch ein 220 µm-Nylonsieb filtriert und ausgiebig mit kaltem destilliertem Wasser gewaschen. Der Rückstand (Epidermisfragmente) wurde in einen kleineren "Waring blender" (Volumen 250 ml) gegeben und in destilliertem Wasser und Eis viermal für je 15 Sekunden bei auf kleiner Stufe zerkleinert. Die Suspension wurde durch ein 220 µm-Nylonsieb filtriert und ausgiebig mit kaltem destilliertem Wasser gewaschen. Die Epidermisfragmente (Rückstand) wurden mikroskopisch hinsichtlich einer Kontamination durch Mesophyllzellen

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

untersucht. Wenn dies der Fall war, wurde der Zerkleinerungsschritt im kleinen "Waring blender" wiederholt. Der Aufschluß der Schließzellen der Epidermisfragmente erfolgte durch Zermörsern in flüssigem Stickstoff in einem gekühlten Mörser für ca. 2 h. Zur Überprüfung des Aufschlusses der Schließzellen wurden regelmäßig Proben genommen und mikroskopisch überprüft. Nach 2 h oder wenn eine genügend große Anzahl von Schließzellen aufgeschlossen wurde, wurde das entstandene Pulver in ein Reaktionsgefäß (Volumen 50 ml) überführt und in einem Volumen GTC-Puffer (Chirgwin et al., Biochem. 18 (1979), 5294-5299) aufgenommen. Die Suspension wurde zentrifugiert und der Überstand durch Miracloth (Calbiochem, La Jolla, Kalifornien) filtriert. Das Filtrat wurde wie in Glisin et al. (Biochemistry 13 (1974), 2633-2637) und Mornex et al. (J. Clin. Inves. 77 (1986), 1952-1961) für 16 h einer Ultrazentrifugation unterzogen. Nach der Zentrifugation wurde der RNA-Niederschlag in 250 µl GTC-Puffer aufgenommen. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,05 Volumen 1 M Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol gefällt. Die RNA wurde abzentrifugiert und der Niederschlag mit 3 M Natriumazetat (pH 4,8) und 70% Ethanol gewaschen. Die RNA wurde kurz getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Aus der isolierten RNA wurde nach Standardverfahren poly A⁺-RNA isoliert. Ausgehend von der poly(A⁺)-mRNA wurde nach der Methode von Gubler und Hoffmann (Gene 25 (1983), 263-269) unter Verwendung eines Xho I-Oligo d(t)₁₈-Primers cDNA hergestellt. Diese wurde nach EcoR I-Linkeraddition mit Xho I nachgeschnitten und orientiert in einen mit EcoR I und Xho I geschnittenen Lambda ZAP II-Vektor (Stratagene, GmbH, Heidelberg, Deutschland) ligiert. Das Verpacken in Phagenköpfe erfolgte unter Verwendung des Gigapack II Gold kit's (Stratagene, GmbH, Heidelberg, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Aus einer derartigen cDNA-Bibliothek wurden nach Standardverfahren Phagenclone isoliert und gereinigt, die mit der cDNA-Insertion aus dem Plasmid pRL1 hybridisieren. Mit Hilfe

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

der *in-vivo-excision*-Methode wurden von positiven Phagenclo-
nen *E. coli*-Klone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBlu-
escript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion enthalten.
Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der
Insertionen wurden geeignete Klone einer Restriktionskartie-
rung und einer Sequenzanalyse unterzogen. Aus einem geeig-
neten Clon wurde das Plasmid pRL2 (DSM 10225) isoliert, das
eine vollständige cDNA enthält, die für ein Stärkekorn-
gebundenes Protein aus Kartoffel codiert.

Beispiel 5

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pRL2

Die Nukleotidsequenz der cDNA-Insertion des Plasmids pRL2
wurde wie in Beispiel 3 beschrieben bestimmt. Die Insertion
ist 4856 bp lang. Die Nukleotidsequenz sowie die daraus ab-
geleitete Aminosäuresequenz ist in Seq ID No. 1 bzw. Seq ID
No. 2 angegeben. Das entsprechende Gen wird im folgenden RL-
Gen genannt.

Beispiel 6

Konstruktion des Plasmids p35S-anti-RL und Einführung des Plasmids in das Genom von Kartoffelpflanzen

Aus dem Plasmid pRL1 wurde mit Hilfe der Restriktionsendonu-
lease Asp718 ein ca. 1800 bp langes DNA-Fragment isoliert.
Dieses entspricht der unter Seq ID No. 3 dargestellten DNA-
Sequenz und enthält einen Teil des offenen Leserahmens. Das
Fragment wurde in den mit Asp718 geschnittenen binären Vek-
tor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990),
221-230) ligiert. Bei diesem handelt es sich um ein Derivat
des binären Vektors pBin19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12
(1984), 8711-8721). pBinAR wurde folgendermaßen konstruiert:

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Ein 529 bp langes Fragment, das die Nukleotide 6909-7437 des 35S-Promotor des Cauliflowermosaik-Virus umfaßt (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294), wurde als *EcoR* I/*Kpn* I-Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al., Nucl. Acids Res. 14, 5857-5868) isoliert und zwischen die *EcoR* I- und die *Kpn* I-Schnittstellen des Polylinkers von pBin19 ligiert. Dabei entstand das Plasmid pBin19-A.

Aus dem Plasmid pAGV40 (Herrera-Estrella et al., Nature 303, 209-213) wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Pvu* II und *Hind* III ein 192 bp langes Fragment isoliert, das das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3, 835-846) umfaßt (Nukleotide 11749-11939). Nach Addition von *Sph* I-Linkern an die *Pvu* I-Schnittstelle wurde das Fragment zwischen die *Sph* I- und *Hind* III-Schnittstellen pBin19-A ligiert. Dabei entstand pBinAR.

Mit Hilfe von Restriktions- und Sequenzanalysen wurden rekombinante Vektoren identifiziert, bei denen das DNA-Fragment derart in den Vektor inseriert ist, daß ein Teil der codierenden Region der cDNA-Insertion aus pRL1 in anti-sense-Orientierung mit dem 35S-Promotor verknüpft ist. Das resultierende Plasmid, p35S-anti-RL, ist in Fig. 1 dargestellt.

Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes entsteht eine Expressionskassette, die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B und C aufgebaut ist:

Das Fragment A (529 bp) enthält den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Das Fragment umfaßt die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294).

Das Fragment B enthält neben flankierenden Bereichen einen Teil der proteincodierenden Region der cDNA-Insertion aus dem Plasmid pRL1. Diese wurde wie oben beschrieben als Asp718-Fragment aus pRL1 isoliert und in anti-sense-Orientierung an den 35S-Promotor in pBinAR fusioniert.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Fragment C (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846).

Die Größe des Plasmids p35S-anti-RL beträgt ca. 12,8 kb.

Das Plasmid wurde mit Hilfe Agrobakterien-vermittelter Transformation in Kartoffelpflanzen transferiert wie oben beschrieben. Aus den transformierten Zellen wurden ganze Pflanzen regeneriert. Die transformierten Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen kultiviert.

Die Überprüfung des Erfolges der genetischen Veränderung der Pflanzen erfolgte durch Analyse der Gesamt-RNA in einer Northern-Blot-Analyse bezüglich des Verschwindens der zu der cDNA komplementären Transkripte. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus Blättern transformierter Pflanzen nach Standardmethoden isoliert, gelelektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz oder einen Teil dieser Sequenz aufweist. In ca. 5-10% der transformierten Pflanzen fehlte in der Northern-Blot-Analyse die Bande, die das spezifische Transkript der unter Seq ID No. 1 dargestellten Sequenz darstellt. Diese Pflanzen wurden zur Analyse der Stärkequalität verwendet.

Beispiel 7

Konstruktion des Plasmids pB33-anti-RL und Einführung des Plasmids in das Genom von Kartoffelpflanzen

Aus dem Plasmid pRL1 wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease Asp718 ein ca. 1800 bp langes DNA-Fragment isoliert, das einen Teil des offenen Leserahmens der cDNA-Insertion umfaßt, und in den mit Asp718 geschnittenen Vektor B33-Hyg ligiert. Dieser Vektor wurde folgendermaßen hergestellt:

Aus dem Vektor pBinAR Hyg (DSM 9505) wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen EcoR I und Asp718 der 35S-Promotor

PCT/EP96/04109

WO 97/11188

entfernt. Aus dem Plasmid p33-anti-BE (DSM 6146) wurde mit Hilfe von EcoR I und Asp718 ein ca. 1526 bp langes Fragment, das den B33-Promotor umfaßt, isoliert und in den mit EcoR I und Asp718 geschnittenen Vektor pBinAR Hyg (DSM 9505) inseriert.

Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes in die Asp718-Schnittstelle des Plasmids B33-Hyg entsteht eine Expressionskassette, die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B und C aufgebaut ist (Fig. 4):

Das Fragment A enthält den B33-Promotor aus *Solanum tuberosum* (EP 3775 092; Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29)

Das Fragment B enthält neben flankierenden Bereichen einen Teil der proteincodierenden Region der cDNA-Insertion aus dem Plasmid pRL1. Diese wurde wie oben beschrieben als Asp718-Fragment aus pRL1 isoliert und in anti-sense-Orientierung an den B33-Promotor in B33-Hyg fusioniert.

Fragment C (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846).

Die Größe des Plasmids pB33-anti-RL beträgt ca. 12,8 kb.

Das Plasmid wurde mit Hilfe Agrobakterien-vermittelter Transformation in Kartoffelpflanzen transferiert wie oben beschrieben. Aus den transformierten Zellen wurden ganze Pflanzen regeneriert. Die transformierten Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen kultiviert.

Die Überprüfung des Erfolges der genetischen Veränderung der Pflanzen erfolgte durch Analyse der Gesamt-RNA in einer Northern-Blot-Analyse bezüglich des Verschwindens der zu der cDNA komplementären Transkripte. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus Knollen transformierter Pflanzen nach Standardmethoden isoliert, gelelektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz oder einen Teil dieser Sequenz aufweist. In ca. 5-10% der transformierten Pflanzen fehlte

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

in der Northern-Blot-Analyse die Bande, die Transkripte darstellt, die mit der erfindungsgemäßen cDNA hybridisieren. Aus diesen Pflanzen wurde aus Knollen die Stärke isoliert und wie in Beispiel 8 beschrieben analysiert.

Beispiel 8

Analyse der transformierten Kartoffelpflanzen

Die gemäß Beispiel 6 und Beispiel 7 transformierten Kartoffelpflanzen wurden hinsichtlich der Eigenschaften der synthetisierten Stärke untersucht. Die Analysen wurden an verschiedenen Linien von Kartoffelpflanzen durchgeführt, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL bzw. mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren und die in der Northern-Blot-Analyse die Bande nicht mehr aufwiesen, die Transkripte darstellt, die mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen hybridisieren.

a) Bestimmung der Viskosität wäßriger Lösungen der Stärke

Zur Bestimmung der Viskosität der wäßrigen Lösungen der in transformierten Kartoffelpflanzen synthetisierten Stärke wurde aus Knollen von Pflanzen, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL bzw. mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren, Stärke nach Standardverfahren isoliert. Es wurden jeweils 30 g Stärke in 450 ml H₂O aufgenommen und für die Analyse in einem Viskograph E (Brabender OHG Duisburg (Deutschland)) verwendet. Der Betrieb des Gerätes erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Viskosität der wäßrigen Lösung der Stärke wurde die Stärkesuspension zunächst von 50°C auf 96°C erhitzt mit einer Geschwindigkeit von 3°C pro min. Anschließend wurde die Temperatur für 30 min bei 96°C gehalten. Danach wurde die Lösung von 96°C auf 50°C abgekühlt mit einer Geschwindigkeit von 3°C pro min. Wäh-

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

rend der gesamten Dauer wurde die Viskosität bestimmt. Repräsentative Ergebnisse derartiger Messungen sind in Form von Kurven, in denen die Viskosität in Abhängigkeit der Zeit dargestellt ist, in Fig. 3, Fig. 4 und Fig. 5 wiedergegeben. Fig. 3 zeigt eine typische Brabenderkurve für Stärke, die aus Wildtyp-Pflanzen der Kartoffelvarietät Désirée isoliert wurde. Fig. 4 und 5 zeigen eine typische Brabenderkurve für Stärke, die aus Kartoffelpflanzen isoliert wurde, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL bzw. pB33-anti-RL transformiert worden waren. Aus den Kurven lassen sich verschiedene charakteristische Werte ableiten.

Für Wildtyppflanzen ergeben sich dabei folgende charakteristische Werte:

Tabelle 1

Wert	Zeit [min : sec]	Drehmoment [BE]	Temperatur [°C]
A	6 : 30	60,5 ± 17,7	69,9 ± 0,57
B	11 : 30	1838,0 ± 161,2	86,0 ± 2,1
C	15 : 15	1412,0 ± 18,4	96,0
D	45 : 15	526,0 ± 17,0	96,0
E	60 : 30	812,0 ± 8,5	50,0
F	70 : 45	853,0 ± 5,7	50,0

Die Werte geben Mittelwerte aus zwei verschiedenen Messungen wieder.

In der Tabelle 1 und den folgenden Tabellen 2 und 3 bedeuten:

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

A: Verkleisterungsbeginn
 B: Maximale Viskosität
 C: Start der Haltezeit
 D: Start der Kühlzeit
 E: Ende der Kühlzeit
 F: Ende der End-Haltezeit.

Für Pflanzen, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL transformiert worden waren (Linie P2), ergeben sich dabei folgende charakteristische Werte:

Tabelle 2

Wert	Zeit [min : sec]	Drehmoment [BE]	Temperatur [°C]
A	6 : 00	50,0	69,0
B	14 : 00	820,0	93,0
C	15 : 15	815,0	96,0
D	45 : 15	680,0	96,0
E	60 : 30	1150,0	50,0
F	70 : 45	1200,0	50,0

Für Pflanzen, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren (Linie P3), ergeben sich dabei folgende Werte:

Tabelle 3

Wert	Zeit [min : sec]	Drehmoment [BE]	Temperatur [°C]
A	7:0	31,0	71,0
B	12:45	671,0	88,3
C	15:15	662,0	96,0
D	45:15	607,0	96,0
E	60:30	1063,0	50,0
F	70:45	1021,0	50,0

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Aus den Figuren 3, 4 und 5 geht deutlich hervor, daß die Stärke aus transformierten Pflanzen sich von der aus Wildtyp-Pflanzen insbesondere dadurch unterscheidet, daß beim Aufkochen nur eine sehr geringe Viskositätszunahme erfolgt. So liegt die maximale Viskosität bei der modifizierten Stärke aus transformierten Pflanzen beim Aufkochen um mehr als 50% unter dem Wert der Wildtyp-Stärke.

Andererseits steigt die Viskosität der aus transformierten Pflanzen isolierten Stärke nach dem Abkühlen stärker an als bei Wildtyp-Stärke.

b) Bestimmung des Phosphatgehaltes der Stärke

Der Phosphatgehalt der Stärke wurde bestimmt, indem die Menge an Phosphat, das an der C-6-Position von Glucoseresiden gebunden war, gemessen wurde. Hierzu wurde Stärke zunächst durch Säurehydrolyse gespalten und anschließend der Gehalt an Glucose-6-Phosphat mittels eines Enzymtests bestimmt, wie im folgenden beschrieben.

100 mg Stärke wurden in 500 µl 0,7 N HCl 4 h bei 100 °C inkubiert. Nach der Säurehydrolyse wurden 10 µl des Ansatzes in 600 µl Imidazolpuffer (100 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂, pH 6,9, 0,4 mM NAD⁺) gegeben. Die Bestimmung der Menge an Glucose-6-Phosphat in dem Ansatz erfolgte durch Umsetzung mit dem Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Dazu wurde dem Ansatz 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (aus *Leuconostoc mesenteroides* (Boehringer Mannheim)) zugesetzt und die Menge an gebildetem NADH durch Messung der Absorption bei 340 nm bestimmt.

Der Gehalt an Glucose-6-Phosphat/Milligramm Stärke ist in der folgenden Tabelle für nicht-transformierte Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée sowie für zwei Linien

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

(P1(35S-anti-RL; P2(35S-anti-RL)) transgener Kartoffelpflanzen, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL transformiert worden waren, angegeben.

Tabelle 4

Pflanzen	nmol Glucose-6-Phosphat/mg Stärke	%
Wildtyp	12,89 ± 1,34	100
P1(35S-anti-RL)	2,25 ± 0,41	17,4
P2(35S-anti-RL)	1,25 ± 0	9,7

Die folgende Tabelle zeigt den Glucose-6-Phosphat-Gehalt pro Milligramm Stärke bei Kartoffelpflanzen, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren, im Vergleich zu Stärke aus nicht-transformierten Pflanzen (*S. tuberosum* c.v. Désirée).

Tabelle 5

Pflanzen	nmol Glucose-6-Phosphat/mg Stärke	%
Wildtyp	9,80 ± 0,68	100
7	4,50 ± 0,73	45,9
37	2,64 ± 0,99	26,9
45	1,14 ± 0,44	11,6
31	1,25 ± 0,49	12,8

Die Pflanzen 7, 37, 45 und 31 stellen unabhängige Transformanten dar, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren. Die Pflanze 37 repräsentiert die Linie P3, für die in Figur 5 eine Brabenderkurve dargestellt ist.

Die Werte zeigen, daß der Phosphatgehalt der modifizierten Stärke aus transgenen Kartoffelpflanzen um mindestens ca. 50% im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen verringert ist.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

c) Bestimmung des Glucose-, Fructose- und Saccharosegehalts von Knollen nach Lagerung bei 4 °C

Knollen von Pflanzen verschiedener transgener Linien, die mit dem antisense-Konstrukt p35S-anti-RL transformiert worden waren, und von Wildtyp-Pflanzen wurden für 2 Monate bei 4 °C bzw. bei 20 °C im Dunkeln gelagert. Anschließend wurden wie oben beschrieben die Mengen an Glucose, Fructose und Saccharose bestimmt. Dabei ergaben sich für zwei transgene Linien folgende repräsentative Werte:

Tabelle 6

	Glucose		Fructose		Saccharose	
	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C
Wildtyp cv Désirée	0,84	55,4	0,62	52,8	8,5	13,1
Transgene Linie 15	1,12	6,7	0,75	7,8	7,5	10,1
Transgene Linie 11	1,00	6,4	0,75	7,5	6,9	6,9

Die Werte in der Tabelle sind in μmol Hexose bzw. Saccharose/ g Frischgewicht angegeben.

Aus den Werten in Tabelle 6 wird deutlich, daß bei den transgenen Pflanzen bei einer Lagerung bei 4 °C eine wesentlich geringere Akkumulation reduzierender Zucker in den Knollen stattfindet als bei Wildtyp-Pflanzen.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Insgesamt ähnelt die aus transgenen Kartoffelpflanzen isolierte modifizierte Stärke der Stärke aus Mais-Wildtyp-Pflanzen. Im Vergleich zu dieser besitzt sie den Vorteil, daß sie geschmacksneutral ist und so für verschiedene Verwendungsmöglichkeiten im Nahrungsmittelbereich besser geeignet ist.

Beispiel 9

Expression der cDNA-Insertion des Plasmids pRL2 in E. coli

(a) Transformation von Bakterienzellen

Zur Expression der cDNA-Insertion des Plasmids pRL2 wurden Zellen des E. coli-Stammes DH5 α zunächst mit dem Plasmid pACAC transformiert. Dieses Plasmid enthält ein DNA-Fragment, das die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) aus E. coli codiert, unter der Kontrolle des lac Z-Promotors. Das Fragment war als ca. 1,7 kb großes DraI/HaeII-Fragment aus dem Vektor pECA-15 (siehe B. Müller-Röber (1992), Dissertation, FU Berlin) isoliert worden und nach Glättung der Enden in einen mit HindIII linearisierten pACAC184-Vektor cloniert worden. Die Expression der AGPase soll eine Steigerung der Glycogensynthese in transformierten E. coli Zellen bewirken. Die derart transformierten Zellen werden im folgenden als E. coli-K1-Zellen bezeichnet.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität des durch die cDNA des Plasmids pRL2 codierten Proteins, wurden E. coli-K1-Zellen mit dem Plasmid pRL2 transformiert. Die transformierten E. coli-Zellen, die sowohl das Plasmid pACAC als auch das Plasmid pRL2 enthalten, werden im folgenden als E. coli-K2-Zellen bezeichnet.

Der Transfer der Plasmid-DNA in die Bakterienzellen erfolgte jeweils nach der Methode von Hanahan (J. Mol. Biol. 166 (1983), 557-580). Die transformierten E. coli

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Zellen wurden auf Agarkulturschalen mit folgender Zusammensetzung ausgestrichen:

YT-Medium mit

1,5% Bacto-Agar
50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2
1% Glucose
10 µg/ml Chloramphenicol bei E. coli-K1-Zellen
bzw.
10 µg/ml Chloramphenicol und
10 µg/ml Ampicillin bei E. coli-K2-Zellen.

Escherichia coli Zellen des Stammes DH5₁, die mit dem Plasmid pRL2 + pACAC (E. coli-K2-Zellen) sowie als Kontrolle nur mit dem Plasmid pACAC (E. coli-K1-Zellen) transformiert worden sind, wurden auf Agarplatten angezogen. Das gebildete Glycogen der verschiedenen Kulturen wurde bezüglich des Phosphorylierungsgrades (an C-6-Position des Glucosemoleküls) hin untersucht, wie im folgenden beschrieben wird.

(b) Isolierung von bakteriellem Glycogen

Zur Isolierung von bakteriellem Glycogen wurde der nach der Transformation gewachsene Bakterienrasen von jeweils 6 Agarplatten (Ø 135 mm) mit 5 ml YT-Medium/Platte abgeschwemmt. Die Bakteriensuspension wurde bei 4500 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der Bakterienniederschlag wurde in 10 ml YT-Medium resuspendiert. Der Aufschluß der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 2 Volumen Aufschlußmedium (0,2 N NaOH; 1% SDS) und Inkubation für 5 Minuten bei RT. Durch Zugabe von 3 Volumen EtOH abs., 30 minütiger Inkubation bei 4°C und anschließender Zentrifugation von 15 Minuten bei 8000 gx wurde das Glycogen sedimentiert. Anschließend wurde der Niederschlag mit 100 ml

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

70%igem EtOH gewaschen und erneut durch einen Zentrifugationsschritt (10 Minuten bei 8000 xg) sedimentiert. Der Waschvorgang wurde 4 mal wiederholt.

(c) Bestimmung des Gesamtglycogengehaltes

Das isolierte und sedimentierte Glycogen wurde zunächst durch saure Hydrolyse (Lösen des Niederschlags in 2 ml 0,7 N HCl; Inkubation für 4 Stunden bei 100°C) in die einzelnen Glucosemoleküle aufgespalten. Der Glucosegehalt der Lösung wurde mittels gekoppelter enzymatischer Reaktion eines Stärke-Tests nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) an einem Photometer (Firma Kontron) bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt.

Der Reaktionspuffer enthält:

100	mM MOPS, pH 7,5
10	mM MgCl ₂
2	mM EDTA
0,25	mM NADP
1	mM ATP
1	U/ml Glucose-6- Phosphat-Dehydrogenase
2	U/ml Hexokinase

Die Messung erfolgte bei 25°C mit 10 µl Glucoselösung.

(d) Bestimmung des Glucose-6-Phosphat Gehaltes

Zur Bestimmung des Gehaltes der an C-6-Position phosphorylierten Glucosemoleküle wurden gleiche Stoffmengen an Glucose, jeweils der verschiedenen Bakterienkulturen, eingesetzt. Durch Zugabe von gleichen Volumina an 0,7 N KOH zu dem mittels saurer Hydrolyse (siehe oben) in seine Glucosemoleküle aufgespaltenen Glycogens, wurde die Lösung neutralisiert.

Der Reaktionspuffer enthält:

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

100 mM MOPS, pH 7,5
10 mM MgCl₂
2 mM EDTA
0,25 mM NADP
2 U/ml Glucose-6-
Phosphat-Dehydrogenase

Die Messung erfolgte bei 25°C mit 100-150 µl Glucoselösung.

(e) Nachweis einer bakteriellen Glycogen phosphorylierenden Enzymaktivität

Die Ergebnisse der Bestimmung des Phosphatgehaltes des in den Bakterienzellen synthetisierten Glycogens zeigen, daß das Glycogen der E. coli Zellen, die mit den Plasmiden pACAC + pRL2 transformiert worden waren, eine bis zu $290 \pm 25\%$ erhöhte Phosphorylierung an C-6-Position der Glucose aufweist, verglichen mit dem Kontrollansatz (E. coli Zellen transformiert mit dem Plasmid pACYC) (siehe folgende Tabelle)

E. coli-Zellen	Glucose-6-Phosphat:Glucose im Glycogen
E. coli-K1	1:(4600 \pm 1150)
E. coli-K2	1:(1570 \pm 390)

Die hier dargestellten Phosphorylierungsgrade sind der Mittelwert aus mindestens 6 Messungen ausgehend von 6 unabhängigen Transformationen und Glycogenisolierungen.

Beispiel 10

Einführung des Plasmids p35S-anti-RL in Kombination mit dem Plasmid p35SH-anti-BE in das Genom von Kartoffelpflanzen

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Das Plasmid p35S-anti-RL wurde konstruiert wie im Beispiel 6 beschrieben. Das Plasmid p35SH-anti-BE wurde konstruiert wie in der Anmeldung WO95/07355, Beispiel 3, beschrieben. Beide Plasmide wurden mit Hilfe der Agrobakterium vermittelter Transformation wie oben beschrieben sequentiell in Kartoffelpflanzen transferiert. Dazu wurde zunächst das Plasmid p35SH-anti-BE in Kartoffelpflanzen transformiert. Es wurden ganze Pflanzen regeneriert und auf eine verringerte Expression des *branching*-Enzyms selektiert. Anschließend wurde das Plasmid p35S-anti-RL in die schon reduzierte Expression des *branching*-Enzyms aufweisenden transgenen Pflanzen transformiert. Aus den transformierten Zellen wurden wiederum transgene Pflanzen regeneriert, und die transformierten Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen kultiviert. Die Überprüfung des Erfolges der genetischen Veränderung der Pflanzen in Bezug auf eine stark reduzierte Expression sowohl des *branching*-Enzyms als auch in Bezug auf eine stark reduzierte Expression des RL-Gens erfolgte durch Analyse der gesamten RNA in einer RNA-Blot-Analyse bezüglich des Verschwindens der zu Verzweigungsenzym-cDNA bzw. RL-cDNA komplementären Transkripte. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus Blätter transformierten Pflanzen nach beschriebenen Methoden isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz oder einen Teil dieser Sequenz aufweist und anschließend mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die Sequenz der Verzweigungsenzym-cDNA (vgl. WO92/14827, Beispiel 1) oder einen Teil derselben aufweist. In ca. 5% - 10% der transformierten Pflanzen fehlte in der RNA-Blot-Analyse sowohl die Bande, die das spezifische Transkript der unter Seq. ID No. 1 dargestellten Sequenz darstellt als auch die Bande, die das spezifische Transkript der Verzweigungsenzym-cDNA (vgl. WO92/14827, Beispiel 1) darstellt. Diese Pflanzen, welche als R4-Pflanzen bezeichnet wurden, wurden zur

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Analyse der Qualität der in den Knollen enthaltenen Stärke eingesetzt.

Beispiel 11

Einführung des Plasmids pB33-anti-RL in Kombination mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI in das Genom von Kartoffelpflanzen

Das Plasmid pB33-anti-RL wurde konstruiert wie im Beispiel 7 beschrieben. Das Plasmid pB33-anti-GBSSI wurde wie folgt konstruiert:

Das *DraI/DraI* Fragment aus der Promotorregion des Patatin Klasse I Gens B33 von *Solanum tuberosum*, umfassend die Nukleotide -1512 bis +14 (Rocha-Sosa et al., EMBO J 8 (1989), 23-29) wurde in die *SmaI* Schnittstelle des Plasmids pUC19 ligiert. Aus dem entstandenen Plasmid wurde das Promotorfragment als *EcoRI/HindIII* Fragment in die *polylinker* Region des Plasmids pBin19 (Bevan, Nucleic Acids Research 12 (1984), 8711-8721) ligiert. Anschließend wurde das 3' *EcoRI* Fragment 1181 bis 2511 des GBSSI-Gens von *Solanum tuberosum* (Hergersberg, Dissertation (1988) Universität zu Köln) in die *EcoRI* Schnittstelle des entstandenen Plasmids ligiert.

Beide Plasmide wurden mit Hilfe Agrobakterium vermittelter Transformation sequentiell in Kartoffelpflanzen transferiert wie unter Beispiel 10 beschrieben. Aus den transformierten Zellen wurden ganze Pflanzen regeneriert, und die transformierten Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen kultiviert. Die Überprüfung des Erfolges der genetischen Veränderungen der Pflanzen erfolgte durch Analyse der Gesamt-RNA in einer RNA-Blot-Analyse bezüglich des Verschwindens der zu den beiden cDNAs komplementären Transkripte. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus Knollen transformierter Pflanzen nach Standardmethoden isoliert, gelelektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz oder einen Teil der Sequenz aufweist. Danach wurde die gleiche Membran mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die Sequenz des GBSSI-Gens oder einen Teil dieser Sequenz aufweist (Hergersberg, Dissertation (1988) Universität zu Köln). In ca. 5% bis 10% der transformierten Pflanzen fehlte in der RNA-Blot-Analyse die Bande, die Transkripte darstellt, die mit der erfindungsgemäßen cDNA bzw. mit der GBSSI-cDNA hybridisierten. Aus den Knollen dieser Pflanzen, welche als R3-Pflanzen bezeichnet wurden, wurde Stärke isoliert und analysiert.

Beispiel 12

Stärkeanalyse der R4-Pflanzen

Die gemäß Beispiel 10 transformierten Kartoffelpflanzen wurden hinsichtlich der Eigenschaften der synthetisierten Stärke untersucht. Die Analysen wurden an verschiedenen Linien von Kartoffelpflanzen durchgeführt, die mit den beiden Plasmiden p35S-anti-RL und p35SH-anti-BE transformiert worden waren und die in der RNA-Blot-Analyse die Banden nicht mehr oder stark reduziert aufwiesen, die Transkripte darstellen, die mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. mit der Sequenz der Verzweigungs-cDNA hybridisieren.

a) Bestimmung der Viskosität wässriger Lösungen der Stärke

Zur Bestimmung der Viskosität der wässrigen Lösungen der in transformierten Kartoffelpflanzen synthetisierten Stärke wurde aus Knollen von Pflanzen, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL und mit dem Plasmid p35SH-anti-BE transformiert worden waren, Stärke nach Standardverfahren isoliert. Es wurden jeweils 2 g Stärke in 25 ml H₂O aufgenommen und für die Analyse in einem Rapid Visco Analyser (Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Group, Warriewood NSW 2102, Australien) verwendet. Der Betrieb des Gerätes erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Viskosität der wäßrigen Lösung der Stärke wurde die Stärkesuspension zunächst von 50°C auf 95°C erhitzt mit einer Geschwindigkeit von 12°C pro min. Anschließend wurde die Temperatur für 2,5 min bei 95°C gehalten. Danach wurde die Lösung von 95°C auf 50°C abgekühlt mit einer Geschwindigkeit von 12°C pro min. Während der gesamten Dauer wurde die Viskosität bestimmt. Repräsentative Ergebnisse derartiger Messungen sind in Form von Kurven, in denen die Viskosität in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt ist, wiedergegeben. Fig. 6 zeigt unter 1 eine typische RVA-Kurve für Stärke, die aus Wildtyp-Pflanzen der Kartoffelvarietät Désirée isoliert wurde. Linie 2 bzw. 3 zeigen typische RVA-Kurven für Stärken, die aus Kartoffelpflanzen isoliert wurde, die mit dem Plasmid p35SH-anti-BE bzw. p35S-anti-RL transformiert worden waren. Linie 4 zeigt eine typische RVA-Kurve für Stärke, die aus den Knollen von Pflanzen isoliert worden ist, die mit dem Plasmid p35SH-anti-BE in Kombination mit dem Plasmid p35S-anti-RL transformiert worden ist. Linie 4 zeichnet sich durch das Fehlen jedweder Viskositätszunahme in Abhängigkeit von der Temperatur aus.

b) Bestimmung des Amylose/Amylopektinverhältnisses

Aus den Knollen von transformierten Kartoffelpflanzen isolierte Stärke wurde auf das Amylose zu Amylopektinverhältnis untersucht. Dabei ergab sich für die Pflanzenlinie R4-1 (dargestellt in Linie 4 der Fig. 6) ein Amylosegehalt von über 70%. Für die Pflanzenlinie R4-3 ergab sich ein Amylosewert von 27%, während der Amylosegehalt in Wildtypstärke aus der Sorte Désirée zwischen 19 und 22% liegt.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Beispiel 13**Stärkeanalyse der R3-Pflanzen**

Die gemäß Beispiel 11 transformierten Kartoffelpflanzen wurden hinsichtlich der Eigenschaften der synthetisierten Stärke untersucht. Die Analysen wurden an verschiedenen Linien von Kartoffelpflanzen durchgeführt, die mit den beiden Plasmiden pB33-anti-RL und pB33-anti-GBSSI transformiert worden waren und die in der RNA-Blot-Analyse die Banden nicht mehr oder stark reduziert aufwiesen, die Transkripte darstellen, die mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. mit der Sequenz der GBSSI-cDNA hybridisieren.

a) Bestimmung der Viskosität wäßriger Lösungen der Stärke

Zur Bestimmung der Viskosität der wäßrigen Lösungen der in transformierten Kartoffelpflanzen synthetisierten Stärke wurde aus Knollen von Pflanzen, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL in Kombination mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI transformiert worden waren, Stärke nach Standardverfahren isoliert. Die Bestimmung der Viskosität mittels eines Rapid Visco Analysers erfolgte nach der in Beispiel 12, Teil a, beschriebenen Methode. Die Ergebnisse sind in Figur 7 dargestellt. Fig. 7 zeigt in Linie 1 eine typische RVA-Kurve für Stärke, die aus Wildtyp-Pflanzen der Kartoffelvarietät Désirée isoliert wurde. Linie 2 bzw. 3 zeigen typische RVA-Kurven für Stärken, die aus Kartoffelpflanzen isoliert wurde, die mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI bzw. p35S-anti-RL transformiert worden waren. Linie 4 zeigt eine typische RVA-Kurve für Stärke, die aus den Kartoffelpflanzen isoliert wurde, die mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI in Kombination mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren. Diese Kurve zeichnet sich durch das Fehlen des Viskositätsmaximums sowie dem Fehlen des Anstiegs der Viskosi-

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

tät bei 50°C aus. Des weiteren zeichnet sich diese Stärke dadurch aus, daß der nach RVA-Behandlung erhaltene Kleister so gut wie keine Retrogradation nach mehrtägiger Inkubation bei Raumtemperatur aufweist.

b) Bestimmung des Amylose/Amylopektinverhältnisses

Aus den Knollen von transformierten Kartoffelpflanzen isolierte Stärke wurde auf das Amylose zu Amylopektinverhältnis untersucht. Dabei ergab sich für die Pflanzenlinie R3-5 (dargestellt in Linie 4 der Fig. 7) ein Amylosegehalt von unter 4%, für die Pflanzenlinie R3-6 ein Amylosegehalt von unter 3%. Der Amylosegehalt in Wildtypstärke aus der Sorte Désirée liegt zwischen 19 und 22% liegt.

c) Bestimmung des Phosphatgehaltes der Stärke

Der Phosphatgehalt der Stärke wurde bestimmt, indem die Menge an Phosphat, das an der C-6-Position von Glucose-resten gebunden war, gemessen wurde. Hierzu wurde Stärke zunächst durch Säurehydrolyse gespalten und anschließend der Gehalt an Glucose-6-Phosphat mittels eines Enzymtests bestimmt, wie im folgenden beschrieben.

100 mg Stärke wurden in 500 µl 0,7 N HCl 4 h bei 100 °C inkubiert. Nach der Säurehydrolyse wurden 10 µl des Ansatzes in 600 µl Imidazolpuffer (100 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂, pH 6,9, 0,4 mM NAD⁺) gegeben. Die Bestimmung der Menge an Glucose-6-Phosphat in dem Ansatz erfolgte durch Umsetzung mit dem Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Dazu wurde dem Ansatz 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (aus *Leuconostoc mesenteroides* (Boehringer Mannheim)) zugesetzt und die Menge an gebildetem NADH durch Messung der Absorption bei 340 nm bestimmt.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Der Gehalt an Glucose-6-Phosphat/Milligramm Stärke ist in der folgenden Tabelle für nicht-transformierte Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée sowie für die Linien R3-5 und R3-6 transgener Kartoffelpflanzen, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL in Kombination mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI transformiert worden waren, angegeben. Zum Vergleich ist der Wert für die Stärke aus der sog. waxy-Kartoffel (US2-10) mit angegeben, die mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI transformiert worden war.

Tabelle 7

Pflanzen	nmol Glucose-6-Phosphat/mg Stärke	%
Wildtyp	9,80 ± 0,68	100
R3-5	1,32 ± 0,10	13
R3-6	1,37 ± 0,15	14
US2-10	10,82 ± 0,42	110

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Jens Koßmann
- (B) STRASSE: Golmer Fichten 9
- (C) ORT: Golm
- (E) LAND: DE
- (F) POSTLEITZAHL: 14476

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Pflanzen, die eine modifizierte Staerke synthetisieren, Verfahren zu ihrer Herstellung, sowie modifizierte Stärke

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4856 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum
- (B) STAMM: C.V. Berolina

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 105..4497

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CATCTTCATC GAATTTCTCG AAGCTTCTTC GCTAATTTCC TGGTTTCTTC ACTCAAATC	60
GACGTTTCTA GCTGAAGTTG AGTGAATTAA GCCAGTGGGA GGAT ATG AGT AAT TCC	116
Met Ser Asn Ser	
1	
TTA GGG AAT AAC TTG CTG TAC CAG GGA TTC CTA ACC TCA ACA GTG TTG	164
Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr Ser Thr Val Leu	
5 10 15 20	
GAA CAT AAA AGT AGA ATC AGT CCT CCT TGT GTT GGA GGC AAT TCT TTG	212
Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly Gly Asn Ser Leu	
25 30 35	
TTT CAA CAA CAA GTG ATC TCG AAA TCA CCT TTA TCA ACT GAG TTT CGA	260

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Phe	Gln	Gln	Gln	Val	Ile	Ser	Lys	Ser	Pro	Leu	Ser	Thr	Glu	Phe	Arg		
			40					45					50				
GGT	AAC	AGG	TTA	AAG	GTG	CAG	AAA	AAG	AAA	ATA	CCT	ATG	GAA	AAG	AAG	308	
Gly	Asn	Arg	Leu	Lys	Val	Gln	Lys	Lys	Lys	Ile	Pro	Met	Glu	Lys	Lys		
		55					60					65					
CGT	GCT	TTT	TCT	AGT	TCT	CCT	CAT	GCT	GTA	CTT	ACC	ACT	GAT	ACC	TCT	356	
Arg	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Ala	Val	Leu	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser		
	70					75					80						
TCT	GAG	CTA	GCA	GAA	AAG	TTC	AGT	CTA	GGG	GGG	AAT	ATT	GAG	CTA	CAG	404	
Ser	Glu	Leu	Ala	Glu	Lys	Phe	Ser	Leu	Gly	Gly	Asn	Ile	Glu	Leu	Gln		
	85				90					95					100		
GTT	GAT	GTT	AGG	CCT	CCC	ACT	TCA	GGT	GAT	GTG	TCC	TTT	GTG	GAT	TTT	452	
Val	Asp	Val	Arg	Pro	Pro	Thr	Ser	Gly	Asp	Val	Ser	Phe	Val	Asp	Phe		
				105					110					115			
CAA	GTA	ACA	AAT	GGT	AGT	GAT	AAA	CTG	TTT	TTG	CAC	TGG	GGG	GCA	GTA	500	
Gln	Val	Thr	Asn	Gly	Ser	Asp	Lys	Leu	Phe	Leu	His	Trp	Gly	Ala	Val		
			120					125					130				
AAA	TTC	GGG	AAA	GAA	ACA	TGG	TCT	CTT	CCG	AAT	GAT	CGT	CCA	GAT	GGG	548	
Lys	Phe	Gly	Lys	Glu	Thr	Trp	Ser	Leu	Pro	Asn	Asp	Arg	Pro	Asp	Gly		
	135						140					145					
ACC	AAA	GTG	TAC	AAG	AAC	AAA	GCA	CTT	AGA	ACT	CCA	TTT	GTT	AAA	TCT	596	
Thr	Lys	Val	Tyr	Lys	Asn	Lys	Ala	Leu	Arg	Thr	Pro	Phe	Val	Lys	Ser		
	150					155					160						
GGC	TCT	AAC	TCC	ATC	CTG	AGA	CTG	GAG	ATA	CGA	GAC	ACT	GCT	ATC	GAA	644	
Gly	Ser	Asn	Ser	Ile	Leu	Arg	Leu	Glu	Ile	Arg	Asp	Thr	Ala	Ile	Glu		
	165				170					175					180		
GCT	ATT	GAG	TTT	CTC	ATA	TAC	GAT	GAA	GCC	CAC	GAT	AAA	TGG	ATA	AAG	692	
Ala	Ile	Glu	Phe	Leu	Ile	Tyr	Asp	Glu	Ala	His	Asp	Lys	Trp	Ile	Lys		
			185					190						195			
AAT	AAT	GGT	GGT	AAT	TTT	CGT	GTC	AAA	TTG	TCA	AGA	AAA	GAG	ATA	CGA	740	
Asn	Asn	Gly	Gly	Asn	Phe	Arg	Val	Lys	Leu	Ser	Arg	Lys	Glu	Ile	Arg		
			200					205					210				
GGC	CCA	GAT	GTT	TCT	GTT	CCT	GAG	GAG	CTT	GTA	CAG	ATC	CAA	TCA	TAT	788	
Gly	Pro	Asp	Val	Ser	Val	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Gln	Ile	Gln	Ser	Tyr		
		215				220						225					
TTG	AGG	TGG	GAG	AGG	AAG	GGA	AAA	CAG	AAT	TAC	CCC	CCT	GAG	AAA	GAG	836	
Leu	Arg	Trp	Glu	Arg	Lys	Gly	Lys	Gln	Asn	Tyr	Pro	Pro	Glu	Lys	Glu		
	230					235					240						
AAG	GAG	GAA	TAT	GAG	GCT	GCT	CGA	ACT	GTG	CTA	CAG	GAG	GAA	ATA	GCT	884	
Lys	Glu	Glu	Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr	Val	Leu	Gln	Glu	Glu	Ile	Ala		
	245				250					255					260		
CGT	GGT	GCT	TCC	ATA	CAG	GAC	ATT	CGA	GCA	AGG	CTA	ACA	AAA	ACT	AAT	932	
Arg	Gly	Ala	Ser	Ile	Gln	Asp	Ile	Arg	Ala	Arg	Leu	Thr	Lys	Thr	Asn		
				265					270						275		

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

GAT AAA AGT CAA AGC AAA GAA GAG CCT CTT CAT GTA ACA AAG AGT GAT Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val Thr Lys Ser Asp 280 285 290	980
ATA CCT GAT GAC CTT GCC CAA GCA CAA GCT TAC ATT AGG TGG GAG AAA Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys 295 300 305	1028
GCA GGA AAG CCG AAC TAT CCT CCA GAA AAG CAA ATT GAA GAA CTC GAA Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile Glu Glu Leu Glu 310 315 320	1076
GAA GCA AGA AGA GAA TTG CAA CTT GAG CTT GAG AAA GGC ATT ACC CTT Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys Gly Ile Thr Leu 325 330 335 340	1124
GAT GAG TTG CGG AAA ACG ATT ACA AAA GGG GAG ATA AAA ACT AAG GTG Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile Lys Thr Lys Val 345 350 355	1172
GAA AAG CAC CTG AAA AGA AGT TCT TTT GCC GTT GAA AGA ATC CAA AGA Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu Arg Ile Gln Arg 360 365 370	1220
AAG AAG AGA GAC TTT GGG CAT CTT ATT AAT AAG TAT ACT TCC AGT CCT Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr Thr Ser Ser Pro 375 380 385	1268
GCA GTA CAA GTA CAA AAG GTC TTG GAA GAA CCA CCA GCC TTA TCT AAA Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro Ala Leu Ser Lys 390 395 400	1316
ATT AAG CTG TAT GCC AAG GAG AAG GAG GAG CAG ATT GAT GAT CCG ATC Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile Asp Asp Pro Ile 405 410 415 420	1364
CTA AAT AAA AAG ATC TTT AAG GTC GAT GAT GGG GAG CTA CTG GTA CTG Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu Leu Leu Val Leu 425 430 435	1412
GTA GCA AAG TCC TCT GGG AAG ACA AAA GTA CAT CTA GCT ACA GAT CTG Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asp Leu 440 445 450	1460
AAT CAG CCA ATT ACT CTT CAC TGG GCA TTA TCC AAA AGT CCT GGA GAG Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Ser Pro Gly Glu 455 460 465	1508
TGG ATG GTA CCA CCT TCA AGC ATA TTG CCT CCT GGG TCA ATT ATT TTA Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly Ser Ile Ile Leu 470 475 480	1556
GAC AAG GCT GCC GAA ACA CCT TTT TCA GCC AGT TCT TCT GAT GGT CTA Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asp Gly Leu 485 490 495 500	1604
ACT TCT AAG GTA CAA TCT TTG GAT ATA GTA ATT GAA GAT GGC AAT TTT Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu Asp Gly Asn Phe 505 510 515	1652

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

GTG GGG ATG CCA TTT GTT CTT TTG TCT GGT GAA AAA TGG ATT AAG AAC Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys Trp Ile Lys Asn 520 525 530	1700
CAA GGG TCG GAT TTC TAT GTT GGC TTC AGT GCT GCA TCC AAA TTA GCA Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala Ser Lys Leu Ala 535 540 545	1748
CTC AAG GCT GCT GGG GAT GGC AGT GGA ACT GCA AAG TCT TTA CTG GAT Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys Ser Leu Leu Asp 550 555 560	1796
AAA ATA GCA GAT ATG GAA AGT GAG GCT CAG AAG TCA TTT ATG CAC CGG Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg 565 570 575 580	1844
TTT AAT ATT GCA GCT GAC TTG ATA GAA GAT GCC ACT AGT GCT GGT GAA Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu 585 590 595	1892
CTT GGT TTT GCT GGA ATT CTT GTA TGG ATG AGG TTC ATG GCT ACA AGG Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg 600 605 610	1940
CAA CTG ATA TGG AAC AAA AAC TAT AAC GTA AAA CCA CGT GAA ATA AGC Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser 615 620 625	1988
AAG GCT CAG GAC AGA CTT ACA GAC TTG TTG CAG AAT GCT TTC ACC AGT Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Ala Phe Thr Ser 630 635 640	2036
CAC CCT CAG TAC CGT GAA ATT TTG CGG ATG ATT ATG TCA ACT GTT GGA His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Thr Val Gly 645 650 655 660	2084
CGT GGA GGT GAA GGG GAT GTA GGA CAG CGA ATT AGG GAT GAA ATT TTG Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu 665 670 675	2132
GTC ATC CAG AGG AAC AAT GAC TGC AAG GGT GGT ATG ATG CAA GAA TGG Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Gln Glu Trp 680 685 690	2180
CAT CAG AAA TTG CAT AAT AAT ACT AGT CCT GAT GAT GTT GTG ATC TGT His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys 695 700 705	2228
CAG GCA TTA ATT GAC TAC ATC AAG AGT GAT TTT GAT CTT GGT GTT TAT Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu Gly Val Tyr 710 715 720	2276
TGG AAA ACC CTG AAT GAG AAC GGA ATA ACA AAA GAG CGT CTT TTG AGT Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser 725 730 735 740	2324
TAT GAC CGT GCT ATC CAT TCT GAA CCA AAT TTT AGA GGA GAT CAA AAG Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly Asp Gln Lys 745 750 755	2372

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

GGT GGT CTT TTG CGT GAT TTA GGT CAC TAT ATG AGA ACA TTG AAG GCA Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala 760 765 770	2420
GTT CAT TCA GGT GCA GAT CTT GAG TCT GCT ATT GCA AAC TGC ATG GGC Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Asn Cys Met Gly 775 780 785	2468
TAC AAA ACT GAG GGA GAA GGC TTT ATG GTT GGA GTC CAG ATA AAT CCT Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro 790 795 800	2516
GTA TCA GGC TTG CCA TCT GGC TTT CAG GAC CTC CTC CAT TTT GTC TTA Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu His Phe Val Leu 805 810 815 820	2564
GAC CAT GTG GAA GAT AAA AAT GTG GAA ACT CTT CTT GAG AGA TTG CTA Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu Glu Arg Leu Leu 825 830 835	2612
GAG GCT CGT GAG GAG CTT AGG CCC TTG CTT CTC AAA CCA AAC AAC CGT Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Pro Asn Asn Arg 840 845 850	2660
CTA AAG GAT CTG CTG TTT TTG GAC ATA GCA CTT GAT TCT ACA GTT AGA Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg 855 860 865	2708
ACA GCA GTA GAA AGG GGA TAT GAA GAA TTG AAC AAC GCT AAT CCT GAG Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Asn Pro Glu 870 875 880	2756
AAA ATC ATG TAC TTC ATC TCC CTC GTT CTT GAA AAT CTC GCA CTC TCT Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser 885 890 895 900	2804
GTG GAC GAT AAT GAA GAT CTT GTT TAT TGC TTG AAG GGA TGG AAT CAA Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln 905 910 915	2852
GCT CTT TCA ATG TCC AAT GGT GGG GAC AAC CAT TGG GCT TTA TTT GCA Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp Ala Leu Phe Ala 920 925 930	2900
AAA GCT GTG CTT GAC AGA ACC CGT CTT GCA CTT GCA AGC AAG GCA GAG Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Ala Glu 935 940 945	2948
TGG TAC CAT CAC TTA TTG CAG CCA TCT GCC GAA TAT CTA GGA TCA ATA Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Ile 950 955 960	2996
CTT GGG GTG GAC CAA TGG GCT TTG AAC ATA TTT ACT GAA GAA ATT ATA Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile 965 970 975 980	3044
CGT GCT GGA TCA GCA GCT TCA TTA TCC TCT CTT CTT AAT AGA CTC GAT Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg Leu Asp 985 990 995	3092

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

CCC GTG CTT CGG AAA ACT GCA AAT CTA GGA AGT TGG CAG ATT ATC AGT Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile Ile Ser 1000 1005 1010	3140
CCA GTT GAA GCC GTT GGA TAT GTT GTC GTT GTG GAT GAG TTG CTT TCA Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ser 1015 1020 1025	3188
GTT CAG AAT GAA ATC TAC GAG AAG CCC ACG ATC TTA GTA GCA AAA TCT Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser 1030 1035 1040	3236
GTT AAA GGA GAG GAG GAA ATT CCT GAT GGT GCT GTT GCC CTG ATA ACA Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu Ile Thr 1045 1050 1055 1060	3284
CCA GAC ATG CCA GAT GTT CTT TCA CAT GTT TCT GTT CGA GCT AGA AAT Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn 1065 1070 1075	3332
GGG AAG GTT TGC TTT GCT ACA TGC TTT GAT CCC AAT ATA TTG GCT GAC Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu Ala Asp 1080 1085 1090	3380
CTC CAA GCA AAG GAA GGA AGG ATT TTG CTC TTA AAG CCT ACA CCT TCA Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser 1095 1100 1105	3428
GAC ATA ATC TAT AGT GAG GTG AAT GAG ATT GAG CTC CAA AGT TCA AGT Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser 1110 1115 1120	3476
AAC TTG GTA GAA GCT GAA ACT TCA GCA ACA CTT AGA TTG GTG AAA AAG Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys Lys 1125 1130 1135 1140	3524
CAA TTT GGT GGT TGT TAC GCA ATA TCA GCA GAT GAA TTC ACA AGT GAA Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr Ser Glu 1145 1150 1155	3572
ATG GTT GGA GCT AAA TCA CGT AAT ATT GCA TAT CTG AAA GGA AAA GTG Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val 1160 1165 1170	3620
CCT TCC TCG GTG GGA ATT CCT ACG TCA GTA GCT CTT CCA TTT GGA GTC Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val 1175 1180 1185	3668
TTT GAG AAA GTA CTT TCA GAC GAC ATA AAT CAG GGA GTG GCA AAA GAG Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala Lys Glu 1190 1195 1200	3716
TTG CAA ATT CTG ATG AAA AAA CTA TCT GAA GGA GAC TTC AGC GCT CTT Leu Gln Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser Ala Leu 1205 1210 1215 1220	3764
GGT GAA ATT CGC ACA ACG GTT TTA GAT CTT TCA GCA CCA GCT CAA TTG Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala Pro Ala Gln Leu 1225 1230 1235	3812

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

GTC AAA GAG CTG AAG GAG AAG ATG CAG GGT TCT GGC ATG CCT TGG CCT 3860
Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro
1240 1245 1250

GGT GAT GAA GGT CCA AAG CGG TGG GAA CAA GCA TGG ATG GCC ATA AAA 3908
Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys
1255 1260 1265

AAG GTG TGG GCT TCA AAA TGG AAT GAG AGA GCA TAC TTC AGC ACA AGG 3956
Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg
1270 1275 1280

AAG GTG AAA CTG GAT CAT GAC TAT CTG TGC ATG GCT GTC CTT GTT CAA 4004
Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu Val Gln
1285 1290 1295 1300

GAA ATA ATA AAT GCT GAT TAT GCA TTT GTC ATT CAC ACA ACC AAC CCA 4052
Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro
1305 1310 1315

TCT TCC GGA GAC GAC TCA GAA ATA TAT GCC GAG GTG GTC AGG GGC CTT 4100
Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg Gly Leu
1320 1325 1330

GGG GAA ACA CTT GTT GGA GCT TAT CCA GGA CGT GCT TTG AGT TTT ATC 4148
Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile
1335 1340 1345

TGC AAG AAA AAG GAT CTC AAC TCT CCT CAA GTG TTA GGT TAC CCA AGC 4196
Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser
1350 1355 1360

AAA CCG ATC GGC CTT TTC ATA AAA AGA TCT ATC ATC TTC CGA TCT GAT 4244
Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp
1365 1370 1375 1380

TCC AAT GGG GAA GAT TTG GAA GGT TAT GCC GGT GCT GGC CTC TAC GAC 4292
Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp
1385 1390 1395

AGT GTA CCA ATG GAT GAG GAG GAA AAA GTT GTA ATT GAT TAC TCT TCC 4340
Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser
1400 1405 1410

GAC CCA TTG ATA ACT GAT GGT AAC TTC CGC CAG ACA ATC CTG TCC AAC 4388
Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn
1415 1420 1425

ATT GCT CGT GCT GGA CAT GCT ATC GAG GAG CTA TAT GGC TCT CCT CAA 4436
Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln
1430 1435 1440

GAC ATT GAG GGT GTA GTG AGG GAT GGA AAG ATT TAT GTC GTT CAG ACA 4484
Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr
1445 1450 1455 1460

AGA CCA CAG ATG T GATTATATTC TCGTTGTATG TTGTTTCAGAG AAGACCACAG 4537
Arg Pro Gln Met

ATGTGATCAT ATTCTCATTG TATCAGATCT GTGACCACTT ACCTGATACC TCCCATGAAG 4597

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

TTACCTGTAT GATTATACGT GATCCAAAGC CATCACATCA TGTTACACCTT CAGCTATTGG 4657
 AGGAGAAGTG AGAAGTAGGA ATTGCAATAT GAGGAATAAT AAGAAAAACT TTGTAAAAGC 4717
 TAAATTAGCT GGGTATGATA TAGGGAGAAA TGTGTAAACA TTGTACTATA TATAGTATAT 4777
 ACACACGCAT TATGTATTGC ATTATGCACT GAATAATATC GCAGCATCAA AGAAGAAATC 4837
 CTTTGGGTGG TTCAAAAA 4856

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1464 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Asn Ser Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr
 1 5 10 15
 Ser Thr Val Leu Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly
 20 25 30
 Gly Asn Ser Leu Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser
 35 40 45
 Thr Glu Phe Arg Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro
 50 55 60
 Met Glu Lys Lys Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr
 65 70 75 80
 Thr Asp Thr Ser Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn
 85 90 95
 Ile Glu Leu Gln Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser
 100 105 110
 Phe Val Asp Phe Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His
 115 120 125
 Trp Gly Ala Val Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp
 130 135 140
 Arg Pro Asp Gly Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro
 145 150 155 160
 Phe Val Lys Ser Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp
 165 170 175
 Thr Ala Ile Glu Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp
 180 185 190
 Lys Trp Ile Lys Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg
 195 200 205

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Lys Glu Ile Arg Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln
210 215 220

Ile Gln Ser Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro
225 230 235 240

Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln
245 250 255

Glu Glu Ile Ala Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu
260 265 270

Thr Lys Thr Asn Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val
275 280 285

Thr Lys Ser Asp Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile
290 295 300

Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile
305 310 315 320

Glu Glu Leu Glu Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys
325 330 335

Gly Ile Thr Leu Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile
340 345 350

Lys Thr Lys Val Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu
355 360 365

Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr
370 375 380

Thr Ser Ser Pro Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro
385 390 395 400

Ala Leu Ser Lys Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile
405 410 415

Asp Asp Pro Ile Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu
420 425 430

Leu Leu Val Leu Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu
435 440 445

Ala Thr Asp Leu Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys
450 455 460

Ser Pro Gly Glu Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly
465 470 475 480

Ser Ile Ile Leu Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser
485 490 495

Ser Asp Gly Leu Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu
500 505 510

Asp Gly Asn Phe Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys
515 520 525

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Trp Ile Lys Asn Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala
530 535 540

Ser Lys Leu Ala Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys
545 550 555 560

Ser Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser
565 570 575

Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr
580 585 590

Ser Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe
595 600 605

Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro
610 615 620

Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn
625 630 635 640

Ala Phe Thr Ser His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met
645 650 655

Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg
660 665 670

Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met
675 680 685

Met Gln Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp
690 695 700

Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp
705 710 715 720

Leu Gly Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu
725 730 735

Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg
740 745 750

Gly Asp Gln Lys Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg
755 760 765

Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala
770 775 780

Asn Cys Met Gly Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val
785 790 795 800

Gln Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu
805 810 815

His Phe Val Leu Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu
820 825 830

Glu Arg Leu Leu Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys
835 840 845

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Pro Asn Asn Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp
850 855 860

Ser Thr Val Arg Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn
865 870 875 880

Ala Asn Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn
885 890 895

Leu Ala Leu Ser Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys
900 905 910

Gly Trp Asn Gln Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp
915 920 925

Ala Leu Phe Ala Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala
930 935 940

Ser Lys Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr
945 950 955 960

Leu Gly Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr
965 970 975

Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu
980 985 990

Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp
995 1000 1005

Gln Ile Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp
1010 1015 1020

Glu Leu Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu
1025 1030 1035 1040

Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val
1045 1050 1055

Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val
1060 1065 1070

Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn
1075 1080 1085

Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys
1090 1095 1100

Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu
1105 1110 1115 1120

Gln Ser Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg
1125 1130 1135

Leu Val Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu
1140 1145 1150

Phe Thr Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu
1155 1160 1165

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Lys Gly Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu
1170 1175 1180

Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly
1185 1190 1195 1200

Val Ala Lys Glu Leu Gln Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp
1205 1210 1215

Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala
1220 1225 1230

Pro Ala Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly
1235 1240 1245

Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp
1250 1255 1260

Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr
1265 1270 1275 1280

Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala
1285 1290 1295

Val Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His
1300 1305 1310

Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val
1315 1320 1325

Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala
1330 1335 1340

Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu
1345 1350 1355 1360

Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile
1365 1370 1375

Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala
1380 1385 1390

Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile
1395 1400 1405

Asp Tyr Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr
1410 1415 1420

Ile Leu Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr
1425 1430 1435 1440

Gly Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr
1445 1450 1455

Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met
1460

80

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1918 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum
- (B) STAMM: C.V. Desiree

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..1555

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCA GAG TGG TAC CAT CAC TTA TTG CAG CCA TCT GCC GAA TAT CTA GGA	48
Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly	
1 5 10 15	
TCA ATA CTT GGG GTG GAC CAA TGG GCT TTG AAC ATA TTT ACT GAA GAA	96
Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu	
20 25 30	
ATT ATA CGT GCT GGA TCA GCA GCT TCA TTA TCC TCT CTT CTT AAT AGA	144
Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg	
35 40 45	
CTC GAT CCC GTG CTT CGG AAA ACT GCA AAT CTA GGA AGT TGG CAG ATT	192
Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile	
50 55 60	
ATC AGT CCA GTT GAA GCC GTT GGA TAT GTT GTC GTT GTG GAT GAG TTG	240
Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu	
65 70 75 80	
CTT TCA GTT CAG AAT GAA ATC TAC GAG AAG CCC ACG ATC TTA GTA GCA	288
Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala	
85 90 95	
AAA TCT GTT AAA GGA GAG GAG GAA ATT CCT GAT GGT GCT GTT GCC CTG	336
Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu	
100 105 110	
ATA ACA CCA GAC ATG CCA GAT GTT CTT TCA CAT GTT TCT GTT CGA GCT	384
Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala	
115 120 125	
AGA AAT GGG AAG GTT TGC TTT GCT ACA TGC TTT GAT CCC AAT ATA TTG	432
Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu	
130 135 140	
GCT GAC CTC CAA GCA AAG GAA GGA AGG ATT TTG CTC TTA AAG CCT ACA	480
Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr	
145 150 155 160	

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

CCT TCA GAC ATA ATC TAT AGT GAG GTG AAT GAG ATT GAG CTC CAA AGT	528
Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser	
165 170 175	
TCA AGT AAC TTG GTA GAA GCT GAA ACT TCA GCA ACA CTT AGA TTG GTG	576
Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val	
180 185 190	
AAA AAG CAA TTT GGT GGT TGT TAC GCA ATA TCA GCA GAT GAA TTC ACA	624
Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr	
195 200 205	
AGT GAA ATG GTT GGA GCT AAA TCA CGT AAT ATT GCA TAT CTG AAA GGA	672
Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly	
210 215 220	
AAA GTG CCT TCC TCG GTG GGA ATT CCT ACG TCA GTA GCT CTT CCA TTT	720
Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe	
225 230 235 240	
GGA GTC TTT GAG AAA GTA CTT TCA GAC GAC ATA AAT CAG GGA GTG GCA	768
Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala	
245 250 255	
AAA GAG TTG CAA ATT CTG ACA AAA AAA CTA TCT GAA GGA GAC TTT AGC	816
Lys Glu Leu Gln Ile Leu Thr Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser	
260 265 270	
GCT CTT GGT GAA ATT CGC ACA ACG GTT TTA GAT CTT TCG ACA CCA GCT	864
Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Thr Pro Ala	
275 280 285	
CAA TTG GTC AAA GAG CTG AAG GAG AAG ATG CAG GGT TCT GGC ATG CCT	912
Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro	
290 295 300	
TGG CCT GGT GAT GAA GGT CCA AAG CGG TGG GAA CAA GCA TGG ATG GCC	960
Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala	
305 310 315 320	
ATA AAA AAG GTG TGG GCT TCA AAA TGG AAT GAG AGA GCA TAC TTC AGC	1008
Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser	
325 330 335	
ACA AGG AAG GTG AAA CTG GAT CAT GAC TAT CTG TGC ATG GCT GTC CTT	1056
Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu	
340 345 350	
GTT CAA GAA ATA ATA AAT GCT GAT TAT GCA TTT GTC ATT CAC ACA ACC	1104
Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr	
355 360 365	
AAC CCA TCT TCC GGA GAC GAC TCA GAA ATA TAT GCC GAG GTG GTC AGG	1152
Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg	
370 375 380	
GGC CTT GGG GAA ACA CTT GTT GGA GCT TAT CCA GGA CGT GCT TTG AGT	1200
Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser	
385 390 395 400	

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

TTT ATC TGC AAG AAA AAG GAT CTC AAC TCT CCT CAA GTG TTA GGT TAC 1248
Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr
405 410 415

CCA AGC AAA CCG ATC GGC CTT TTC ATA AAA AGA TCT ATC ATC TTC CGA 1296
Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg
420 425 430

TCT GAT TCC AAT GGG GAA GAT TTG GAA GGT TAT GCC GGT GCT GGC CTC 1344
Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu
435 440 445

TAC GAC AGT GTA CCA ATG GAT GAG GAG GAA AAA GTT GTA ATT GAT TAC 1392
Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr
450 455 460

TCT TCC GAC CCA TTG ATA ACT GAT GGT AAC TTC CGC CAG ACA ATC CTG 1440
Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu
465 470 475 480

TCC AAC ATT GCT CGT GCT GGA CAT GCT ATC GAG GAG CTA TAT GGC TCT 1488
Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser
485 490 495

CCT CAA GAC ATT GAG GGT GTA GTG AGG GAT GGA AAG ATT TAT GTC GTT 1536
Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val
500 505 510

CAG ACA AGA CCA CAG ATG T GATTATATTC TCGTTGTATG TTGTTTCAGAG 1585
Gln Thr Arg Pro Gln Met
515

AAGACCACAG ATGTGATCAT ATTCTCATTG TATCAGATCT GTGACCACTT ACCTGATACC 1645

TCCCATGAAG TTACCTGTAT GATTATACGT GATCCAAAGC CATCACATCA TGTTCCACCTT 1705

CAGCTATTGG AGGAGAAAGTG AGAAGTAGGA ATTGCAATAT GAGGAATAAT AAGAAAAACT 1765

TTGTAAAAGC TAAATTAGCT GGGTATGATA TAGGGAGAAA TGTGTAAACA TTGTACTATA 1825

TATAGTATAT ACACACGCAT TATGTATTGC ATTATGCACT GAATAATATC GCAGCATCAA 1885

AGAAGAAATC CTTTGGGTGG TTTCAAAAAA AAA 1918

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 518 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly
1 5 10 15

Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu
20 25 30

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg
 35 40 45
 Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile
 50 55 60
 Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu
 65 70 75 80
 Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala
 85 90 95
 Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu
 100 105 110
 Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala
 115 120 125
 Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu
 130 135 140
 Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr
 145 150 155 160
 Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val
 180 185 190
 Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr
 195 200 205
 Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly
 210 215 220
 Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe
 225 230 235 240
 Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala
 245 250 255
 Lys Glu Leu Gln Ile Leu Thr Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser
 260 265 270
 Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Thr Pro Ala
 275 280 285
 Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro
 290 295 300
 Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala
 305 310 315 320
 Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser
 325 330 335
 Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu
 340 345 350

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr
355 360 365

Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg
370 375 380

Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser
385 390 395 400

Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr
405 410 415

Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg
420 425 430

Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu
435 440 445

Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr
450 455 460

Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu
465 470 475 480

Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser
485 490 495

Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val
500 505 510

Gln Thr Arg Pro Gln Met
515

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEM MIKROORGANISMUS

(Regel 13^{bi} PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus, der in der Beschreibung genannt ist auf Seite <u>35</u> , Zeile <u>1-13</u>	
B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet <input type="checkbox"/>	
Name der Hinterlegungsstelle DSM Deutsche Sammlung von Mikroorganismen	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Datum der Hinterlegung 20.10.1994 20.08.1990 04.09.1995	Eingangsnummer DSM 9505 DSM 6146 DSM 10225
C. WEITERE ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen) Die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input type="checkbox"/>	
Der Anmelder nimmt Regel 20(4) EPÜ in Anspruch.	
D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN (falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)	
EP	
E. NACHREICHUNG VON ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen)	
Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen, z. B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")	

<div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Nur zur Verwendung im Anmeldeamt</div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 5px;"><input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung</div> <div style="border-top: 1px solid black; height: 40px; margin-top: 5px;"></div>	<div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Nur zur Verwendung im Internationalen Büro</div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 5px;"><input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen am:</div> <div style="border-top: 1px solid black; height: 40px; margin-top: 5px;"></div>
--	--

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Nucleinsäuremolekül, das für ein Protein codiert, das in pflanzlichen Zellen sowohl an Stärkekörner gebunden vorliegt, als auch in löslicher Form, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - (a) Nucleinsäuremolekülen, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
 - (b) Nucleinsäuremolekülen, die die codierende Region der unter Seq ID No. 1 angegebenen Nucleotidsequenz umfassen;
 - (c) Nucleinsäuremolekülen, die mit den unter (a) oder (b) genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisieren;
 - (d) Nucleinsäuremolekülen, deren Sequenz aufgrund des genetischen Codes degeneriert ist im Vergleich zu den Sequenzen der unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküle; und
 - (e) Fragmenten, Derivaten oder allelischen Varianten der unter (a) bis (d) genannten Nucleinsäuremoleküle.
2. Vektor enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1.
3. Vektor nach Anspruch 2, wobei das Nucleinsäuremolekül verknüpft ist mit regulatorischen Elementen, die die Transkription in eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen gewährleisten.
4. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder einem Vektor nach Anspruch 2 oder 3.
5. Wirtszelle nach Anspruch 4, die eine transgene Pflanzenzelle ist.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

6. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 5.
7. Stärke erhältlich aus Pflanzenzellen nach Anspruch 5 oder einer Pflanze nach Anspruch 6.
8. Verfahren zur Herstellung eines Proteins, das in pflanzlichen Zellen sowohl an Stärkekörner gebunden vorliegt als auch in löslicher Form, bei dem eine Wirtszelle nach Anspruch 4 unter Bedingungen kultiviert wird, die die Expression des Proteins erlauben, und das Protein aus den Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.
9. Protein, das durch ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 codiert wird oder das erhältlich ist durch ein Verfahren nach Anspruch 8.
10. Antikörper, der spezifisch ein Protein nach Anspruch 9 erkennt.
11. Nucleinsäuremolekül von mindestens 15 Nucleotiden Länge, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 hybridisiert.
12. DNA-Molekül codierend eine antisense-RNA, die komplementär ist zu Transkripten eines DNA-Moleküls nach Anspruch 1.
13. DNA-Molekül codierend eine RNA mit Ribozymaktivität, die spezifisch Transkripte eines DNA-Moleküls nach Anspruch 1 spaltet.
14. DNA-Molekül, codierend eine RNA, die bei Expression in einer pflanzlichen Zelle aufgrund eines Cosuppressions-Effektes zur Verringerung der Expression eines Nucleinsäuremoleküls nach Anspruch 1 führt.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

15. Vektor enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 12 bis 14.
16. Vektor nach Anspruch 15, wobei das DNA-Molekül kombiniert ist mit regulatorischen DNA-Elementen, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten.
17. Wirtszelle enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 12 bis 14 oder einen Vektor nach Anspruch 15 oder 16.
18. Transgene Pflanzenzelle enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 12 bis 14 in Kombination mit regulatorischen DNA-Elementen, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten.
19. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 18, bei der die Aktivität mindestens eines weiteren, an der Stärkebiosynthese oder -modifikation beteiligten Enzyms verringert ist im Vergleich zu nichttransformierten Pflanzen.
20. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 19, bei der die Aktivität eines Verzweigungsenzyms verringert ist.
21. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 20, bei der die Aktivität einer stärkekorngelassenen Stärkesynthase der Isoform I (GBSSI) verringert ist.
22. Transgene Pflanze erhältlich durch Regeneration einer Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 18 bis 21.
23. Stärke erhältlich aus Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 18 bis 21 oder Pflanzen nach Anspruch 22.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

24. RNA-Molekül erhältlich durch Transkription eines DNA Moleküls nach einem der Ansprüche 12 bis 14.
25. Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, dadurch gekennzeichnet, daß in den Zellen die Menge von Proteinen nach Anspruch 10 verringert wird, die endogen in der Zelle synthetisiert werden.
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Verringerung der Menge der Proteine nach Anspruch 10 in den Zellen durch einen antisense-Effekt erzielt wird.
27. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Verringerung der Menge der Proteine nach Anspruch 10 in den Zellen durch einen Ribozymeffect erzielt wird.
28. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Verringerung der Menge der Proteine nach Anspruch 10 in den Zellen durch einen Cosuppressions-Effekt erzielt wird.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 28, wobei die Enzymaktivität mindestens eines weiteren an der Stärkebiosynthese und/oder Modifikation beteiligten Enzyms reduziert wird.
30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei das Enzym ein Verzweigungsenzym ist.
31. Verfahren nach Anspruch 29, wobei das Enzym eine stärkekornggebundene Stärkesynthase der Isoform I (GBSSI) ist.
32. Pflanzenzelle erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 31.

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

33. Transgene Pflanze erhältlich durch Regeneration der Pflanzenzelle nach Anspruch 32.
34. Stärke erhältlich aus Pflanzenzellen nach Anspruch 32 oder einer Pflanze nach Anspruch 33.
35. Stärke nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Kartoffel stammt.
36. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach Anspruch 6 enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 5.
37. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach Anspruch 22 oder 32, enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 18 bis 21 oder nach Anspruch 32.
38. Transgene Pflanze nach Anspruch 22 oder 33, die eine Kartoffelpflanze ist.
39. Knolle einer Kartoffelpflanze nach Anspruch 38.
40. Knolle nach Anspruch 39, die im Vergleich zu Knollen von Wildtyp-Pflanzen ein verringertes "cold sweetening" aufweist.

03/09/1997 17:15

+49-331-27567-77

▲ PLANTTEC GMBH

S. 95

+49 331 27567 77

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

1/4

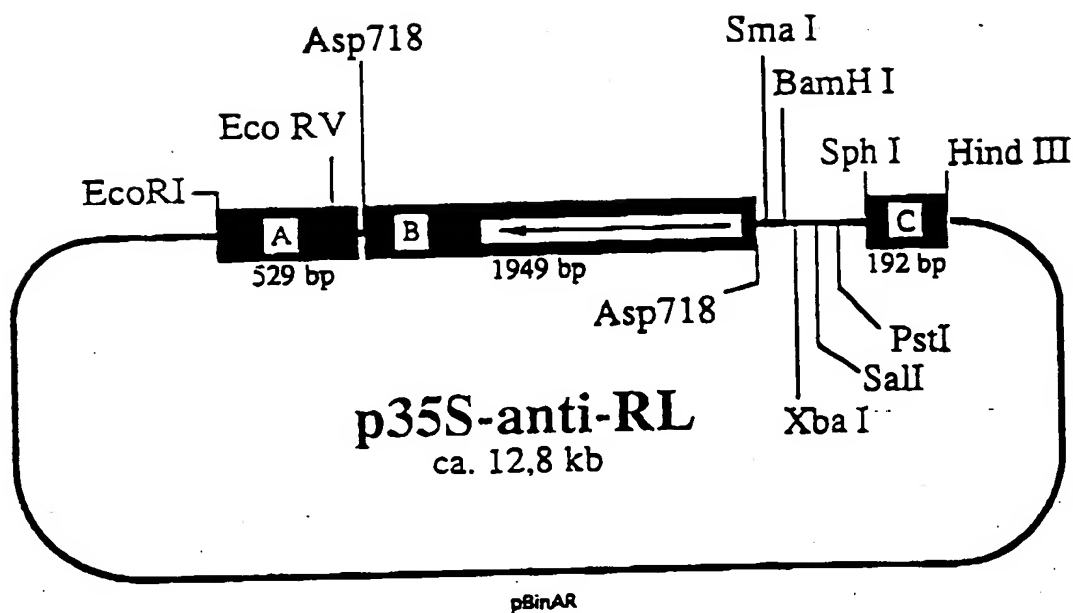


Fig. 1

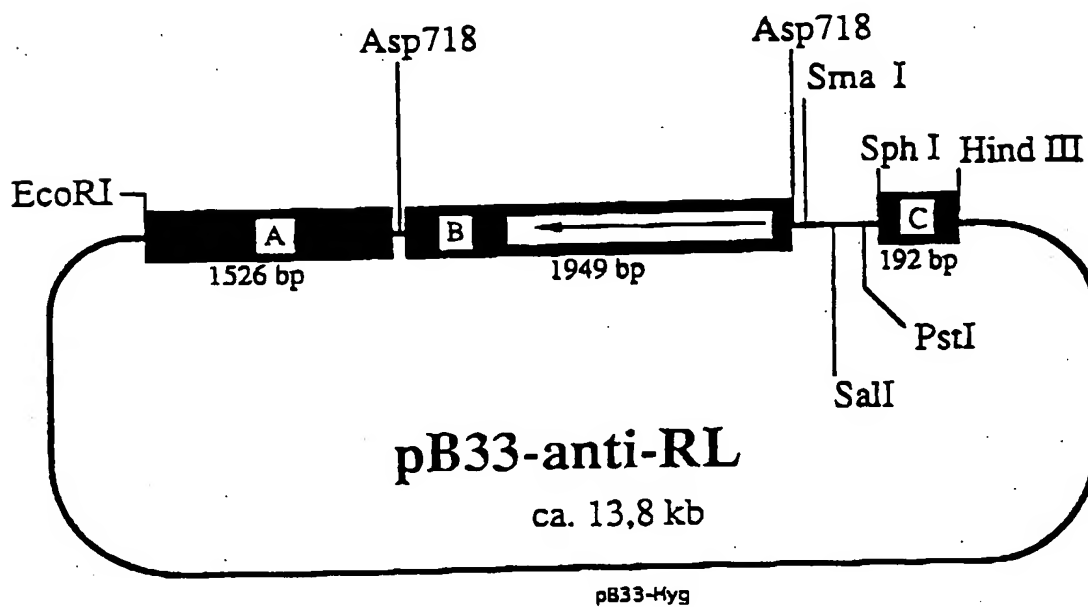


Fig. 2

03/09/1997 17:15

+49-331-27567-77

▲ PLANTTEC GMBH

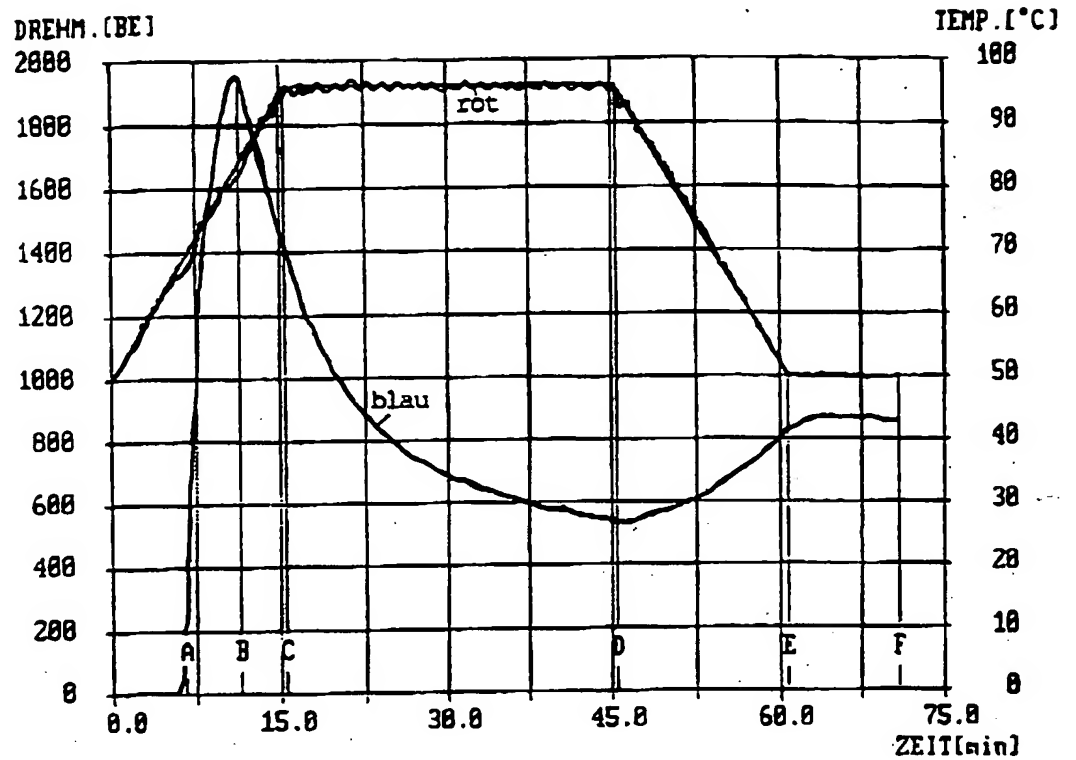
S. 97

+49 331 27567 77

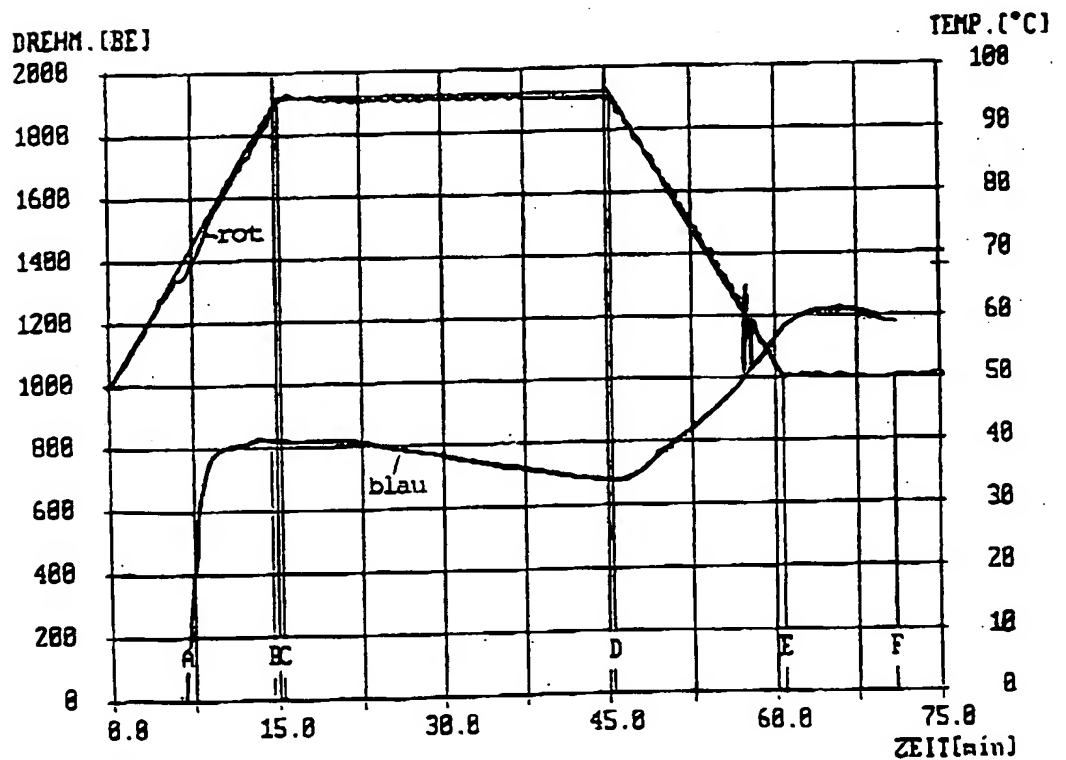
WO 97/11188

PCT/EP96/04109

2/4



Figur 3



Figur 4

03/09/1997 17:15

+49-331-27567-77

▲ PLANTTEC GMBH

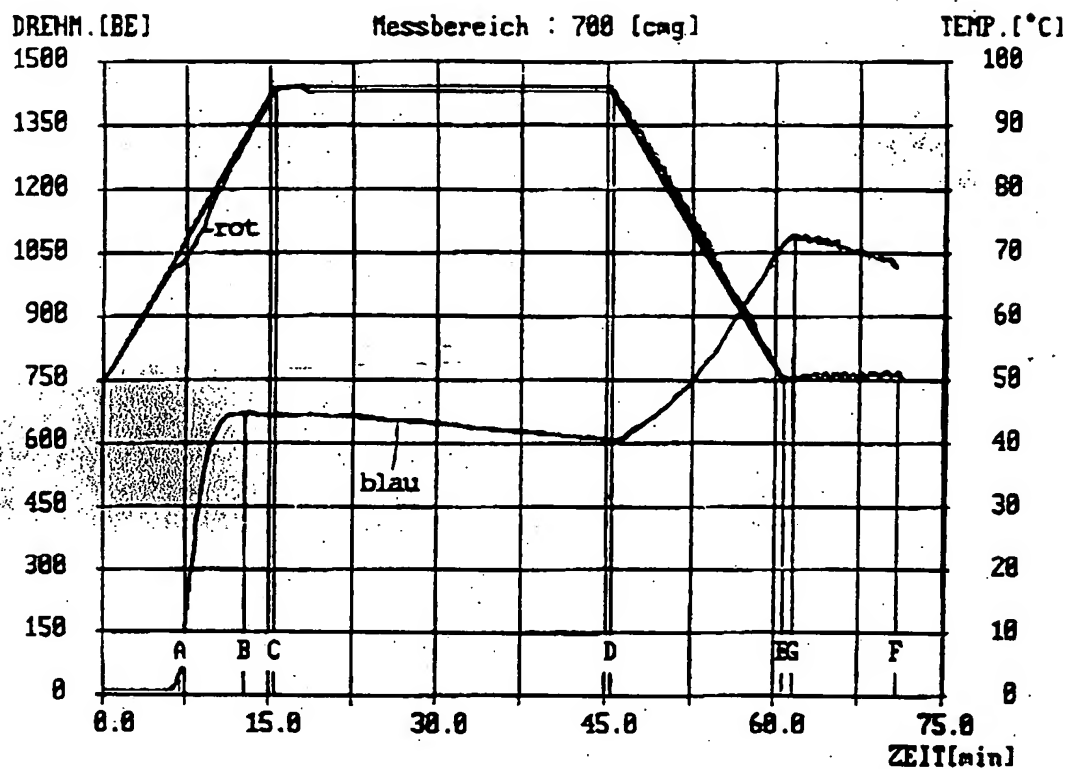
S. , 99 ,

+49 331 27567 77

WO 97/11188

PCT/EP96/04109

3/4

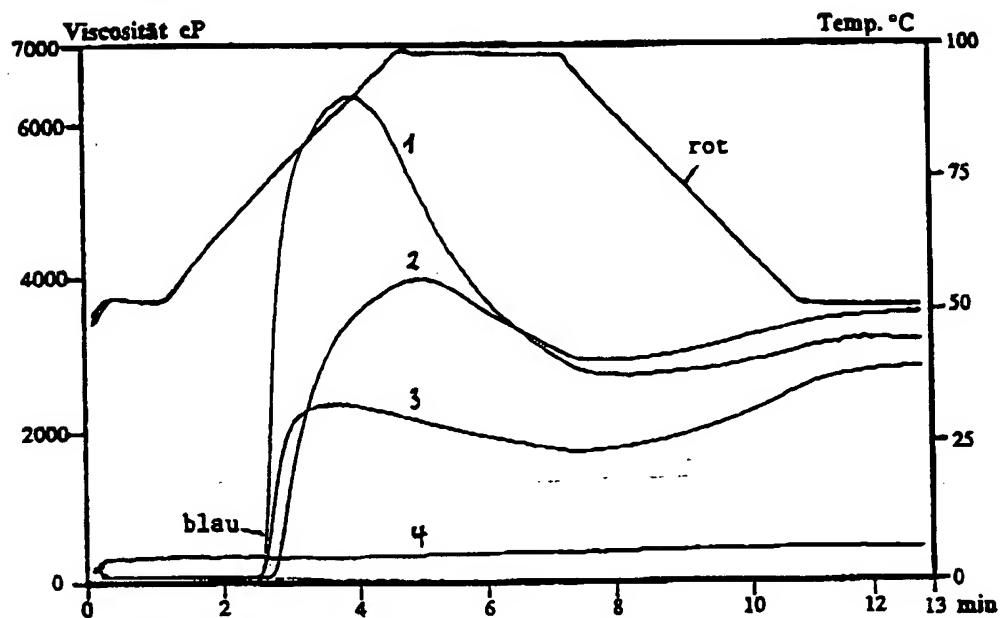


Figur 5

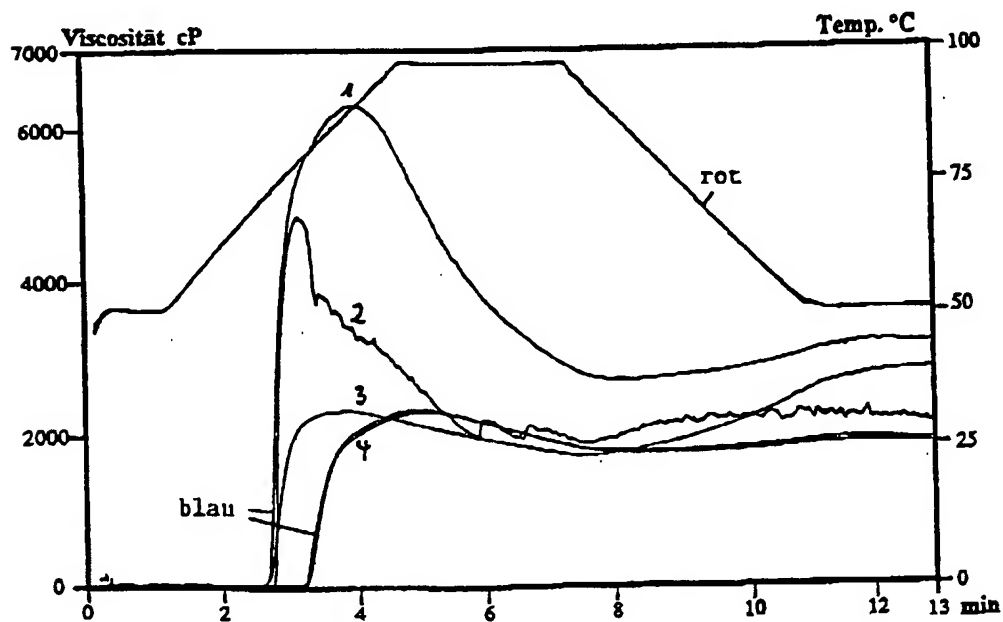
WO 97/11188

PCT/EP96/04109

4/4



Figur 6



Figur 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/EP 96/04109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N15/11
C07K16/16

C12N5/10

A01H5/00

C07K14/415

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 262, no. 35, 1987, pages 17026-17030, XP000616262 KONECKI, D.S. ET AL.: "The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin" see figure 1	1-4, 9-17,24
X	WO 92 11375 A (AMYLOGENE HB) 9 July 1992 see the whole document	23,34,35
X	WO 94 09144 A (ZENECA LTD) 28 April 1994 see the whole document	23,34,35
X	WO 95 07355 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;KOSSMANN JENS (DE); VIRGIN IVAR (DE) 16 March 1995 see the whole document	23,34,35
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 January 1997

Date of mailing of the international search report

26.02.97

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patendaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/EP 96/04109

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 95 26407 A (NAT STARCH CHEM INVEST ; COOKE DAVID (GB); GIDLEY MICHAEL JOHN (GB)) 5 October 1995 see the whole document -----	23,34,35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat'l Application No

PCT/EP 96/04109

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9211375	09-07-92	SE-B- 467160	01-06-92
		AU-A- 9109791	22-07-92
		EP-A- 0563201	06-10-93
		PL-B- 169859	30-09-96
		SE-A- 9004095	01-06-92

WO-A-9409144	28-04-94	AU-A- 2696492	09-05-94
		EP-A- 0664835	02-08-95

WO-A-9507355	16-03-95	DE-A- 4330960	16-03-95
		AU-A- 7657394	27-03-95
		EP-A- 0719338	03-07-96
		CA-A- 2171313	16-03-95

WO-A-9526407	05-10-95	AU-A- 1902895	17-10-95
		CA-A- 2186399	05-10-95
		EP-A- 0754235	22-01-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 96/04109

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C12N15/82 C12N15/11 C12N5/10 A01H5/00 C07K14/415
 C07K16/16

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
 IPK 6 C12N A01H C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 262, Nr. 35, 1987, Seiten 17026-17030, XP000616262 KONECKI, D.S. ET AL.: "The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin" siehe Abbildung 1	1-4, 9-17,24
X	WO 92 11375 A (AMYLOGENE HB) 9.Juli 1992 siehe das ganze Dokument	23,34,35
X	WO 94 09144 A (ZENECA LTD) 28.April 1994 siehe das ganze Dokument	23,34,35
X	WO 95 07355 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;KOSSMANN JENS (DE); VIRGIN IVAR (DE) 16.März 1995 siehe das ganze Dokument	23,34,35
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Januar 1997

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

26.02.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (- 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hillenbrand, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 96/04109

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 95 26407 A (NAT STARCH CHEM INVEST ;COOKE DAVID (GB); GIDLEY MICHAEL JOHN (GB)) 5.Oktober 1995 siehe das ganze Dokument -----	23,34,35

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 96/04109

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9211375	09-07-92	SE-B- 467160	01-06-92
		AU-A- 9109791	22-07-92
		EP-A- 0563201	06-10-93
		PL-B- 169859	30-09-96
		SE-A- 9004095	01-06-92
WO-A-9409144	28-04-94	AU-A- 2696492	09-05-94
		EP-A- 0664835	02-08-95
WO-A-9507355	16-03-95	DE-A- 4330960	16-03-95
		AU-A- 7657394	27-03-95
		EP-A- 0719338	03-07-96
		CA-A- 2171313	16-03-95
WO-A-9526407	05-10-95	AU-A- 1902895	17-10-95
		CA-A- 2186399	05-10-95
		EP-A- 0754235	22-01-97

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)